



UNIVERSIDADE DE LISBOA

Faculdade de Medicina Veterinária

AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE COX-2 EM TUMORES MAMÁRIOS DA GATA POR  
IMUNOHISTOQUÍMICA - CORRELAÇÃO COM ASPETOS CLINICOPATOLÓGICOS,  
CLASSIFICAÇÃO HISTOPATOLÓGICA E POSSÍVEIS IMPLICAÇÕES CLÍNICAS

DANIELA ERICA DE HORTA E GOES RIBEIRO DA CUNHA

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutor Mário António Pereira da Silva  
Soares de Pinho

Doutora Maria da Conceição da Cunha e  
Vasconcelos Peleteiro

Doutor Jorge Manuel de Jesus Correia

Doutor Fernando António da Costa Ferreira

ORIENTADOR

Doutor Fernando António da Costa Ferreira

CO-ORIENTADORA

Doutora Maria da Conceição da Cunha e  
Vasconcelos Peleteiro

2013

LISBOA

---



UNIVERSIDADE DE LISBOA

Faculdade de Medicina Veterinária

AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE COX-2 EM TUMORES MAMÁRIOS DA GATA POR  
IMUNOHISTOQUÍMICA - CORRELAÇÃO COM ASPETOS CLINICOPATOLÓGICOS,  
CLASSIFICAÇÃO HISTOPATOLÓGICA E POSSÍVEIS IMPLICAÇÕES CLÍNICAS

DANIELA ERICA DE HORTA E GOES RIBEIRO DA CUNHA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutor Mário António Pereira da Silva  
Soares de Pinho

Doutora Maria da Conceição da Cunha e  
Vasconcelos Peleteiro

Doutor Jorge Manuel de Jesus Correia

Doutor Fernando António da Costa Ferreira

ORIENTADOR

Doutor Fernando António da Costa Ferreira

CO-ORIENTADORA

Doutora Maria da Conceição da Cunha e  
Vasconcelos Peleteiro

2013

LISBOA

---

## **Agradecimentos**

Ao Professor Doutor Fernando Ferreira, pela dedicação, ajuda e preocupação demonstradas ao longo do período de estágio e pelo incentivo para fazer sempre mais e melhor.

À Professora Doutora Conceição Peleteiro, por toda a ajuda e paciência e pela transmissão de conhecimentos essenciais para a realização do estágio.

À Dra. Maria João Soares cujo apoio foi fundamental. Muito obrigada por toda a ajuda e preocupação.

Agradeço ainda ao Dr. João Cota pela paciência e ajuda.

Um muito obrigada à Dra. Sandra Carvalho por estar sempre disponível para ajudar e por todos os conhecimentos transmitidos.

À D<sup>a</sup>. Maria Augusta e D<sup>a</sup>. Maria do Rosário por estarem sempre disponíveis e prontas a ajudar.

Agradeço à Professora Doutora Luísa Mateus a cedência do anticorpo anti-COX2, Clone 33 e à A. Menarini Diagnostics, Lda. por ter fornecido o anticorpo anti-COX2, Clone SP21.

Agradeço também à Merial Portuguesa - Saúde Animal Lda, o “kit” de deteção gentilmente fornecido.

A todos os colegas que me acompanharam durante o estágio, Daniela, André, Nuno e Tiago. Obrigada pela companhia e ajuda.

À Daniela e à Sofia que me acompanharam (e aturaram) durante todo o curso e partilharam comigo todos os bons e maus momentos: obrigada.

Agradeço ainda ao Fábio e à Andreza que me apoiam sempre que preciso.

Ao Tim que cresceu comigo, que me acompanhou sempre e que infelizmente já cá não está.

A todos os animais dos canis e estábulos da Faculdade de Medicina Veterinária que tanto nos ajudam a aprender.

Aos meus pais, à minha avó e ao meu irmão, que ficaram tão felizes quando comecei esta fase da minha vida e que sempre me apoiaram em tudo! Muito obrigada.

Ao meu avô, que sempre teve um dom especial para animais e que, infelizmente, não esteve presente para me ajudar e apoiar durante este percurso.

## **Resumo**

### **Avaliação da Expressão de Cox-2 em Tumores Mamários da Gata por Imunohistoquímica - Correlação Com Aspetos Clinicopatológicos, Classificação Histopatológica e Possíveis Implicações Clínicas**

A cicloxigenase-2 (Cox-2) é uma enzima que desempenha um papel importante na tumorigênese e encontrando-se sobreexpressa em várias neoplasias humanas, incluindo o cancro da mama. Em medicina veterinária, alguns trabalhos mostram existir uma sobreexpressão da Cox-2 em certas neoplasias da espécie felina, incluindo nos tumores mamários, estando esta associada a pior prognóstico. Tendo em conta estas evidências, a utilização de fármacos anti-Cox-2 como agentes terapêuticos nas neoplasias mamárias é uma hipótese que poderá trazer benefícios importantes. A utilização destes fármacos poderá assumir particular interesse no caso da gata, devido à elevada frequência de tumores mamários nesta espécie e ao seu prognóstico pouco favorável. Desta forma, para além de poder funcionar como alvo terapêutico, a Cox-2 poderá também ser um bom indicador de prognóstico.

Neste trabalho pretendeu-se analisar os níveis de expressão da Cox-2, de modo a melhor equacionar a sua importância como futuro alvo terapêutico. Assim, procedeu-se à avaliação dos níveis desta enzima numa amostra de 21 carcinomas mamários felinos de diversos tipos histológicos e graus de malignidade, pela técnica de imunohistoquímica (IHQ), recorrendo ao uso de dois anticorpos anti-Cox-2 distintos. Foi ainda analisada a correlação dos níveis de expressão desta enzima com diversos parâmetros clinicopatológicos e imunohistoquímicos.

Com o Clone 33, todas as neoplasias estudadas revelaram expressão de COX-2, apesar de apenas um tumor ter sido classificado de positivo, tendo mostrado um padrão de imunomarcção perinuclear e citoplasmático. Pelo contrário, com o Clone SP21 a maioria dos tumores (20/21) foram considerados positivos, apresentando um padrão predominantemente membranar, mas também marcação citoplasmática e perinuclear. Este padrão citoplasmático e perinuclear foi observado nos mesmos tumores, em ambos os anticorpos. Verificou-se ainda a existência de uma correlação entre os níveis de marcação da Cox-2 (Clone SP21) e a classificação histológica segundo a OMS.

Ainda que mais investigação seja necessária, é possível concluir que o padrão de marcação da Cox-2, associado à classificação histológica poderá ter um papel na identificação de pacientes que irão beneficiar da utilização terapêutica de fármacos anti-Cox-2.

**Palavras-chave:** gata, tumores mamários, Cox-2, imunohistoquímica, fármacos anti-Cox-2

## **Abstract**

### **Immunohistochemical Evaluation of Cox-2 Expression in Feline Mammary Tumours – Correlation with Clinicopathological Features, Histologic Type and Possible Clinical Implications**

Cyclooxygenase-2 (COX-2) is an enzyme that plays an important role in tumorigenesis and is overexpressed in several types of human neoplasia, including breast cancer. In veterinary medicine, some studies show that Cox-2 is overexpressed in several tumours of the cat, including mammary tumours. This overexpression is associated with poor prognosis. All this facts lead to the conclusion that the use of anti-Cox-2 drugs in mammary tumours may yield important benefits. The use of such drugs in the queen is especially attractive since this type of neoplasia is highly frequent and also because of its less favourable prognosis. Cox-2 expression may also be a good prognostic indicator.

In the present study the goal was to evaluate Cox-2 expression levels in order to explore its importance as a future therapeutic target. The expression of COX-2 was analysed in 21 tumour samples that included several histological types and grades, by immunohistochemistry (IHC), using two different anti-Cox-2 antibodies. The correlation between Cox-2 expression and several clinicopathological and immunohistochemical parameters was also investigated.

With Clone 33 all samples revealed Cox-2 expression, even though only one tumour was classified as positive, showing perinuclear and cytoplasmic labelling. Conversely, with Clone SP21 most tumours (20/21) were positive, showing mainly membrane labelling but also perinuclear and cytoplasmic staining. The cytoplasmic and perinuclear pattern was constant in the same tumours with both antibodies. A statistically significant correlation between Cox-2 expression levels and histological type according to the WHO classification was also found.

Although, more investigation is necessary, it is possible to conclude that immunolabelling pattern associated with the histological classification may play an important role in selecting the patients that can benefit from the therapeutic use of anti-Cox-2 drugs.

**Keywords:** queen, mammary tumours, Cox-2, immunohistochemistry, anti-Cox-2 drugs.

## Índice geral

Agradecimentos .....	i
Resumo .....	ii
Abstract .....	iii
Índice geral .....	iv
Lista de figuras .....	vi
Lista de tabelas.....	vii
Lista de símbolos e abreviaturas.....	viii
1. Descrição das atividades do estágio .....	1
2. Revisão bibliográfica .....	1
2.1 Introdução .....	1
2.2 Neoplasias mamárias na gata .....	2
2.2.1 Anatomia e histologia da glândula mamária .....	2
2.2.2 Epidemiologia .....	3
2.2.3 Características macroscópicas .....	4
2.2.4 Etiologia .....	5
2.2.4.1 Factores hormonais .....	5
2.2.4.2 Fatores genéticos .....	8
2.2.4.3 Outros fatores.....	10
2.2.5 Diagnóstico .....	11
2.2.6 Classificação histológica .....	13
2.2.7 Tratamento .....	15
2.2.8 Prognóstico .....	17
2.3 A Cicloxigenase-2 e as neoplasias mamárias felinas .....	18
2.3.1 As cicloxigenases (Cox) .....	18
2.3.2 Ativação da Cox-2.....	19
2.3.3 Expressão da Cox-2 nas Neoplasias .....	20
2.3.4 PGE2 e a sua ação .....	25
2.3.4.1 EGFR e a metastização.....	26
2.3.4.2 Inibição da apoptose .....	27
2.3.4.2.1 Recetor ativado $\delta$ por proliferadores peroxissomais (PPAR $\delta$ ) ou PPAR $\beta$ .....	27
2.3.4.2.2 Fatores e mediadores anti-apoptóticos: Bcl-2 e NFkB.....	28
2.3.4.3 RAS e a proliferação celular .....	28

2.3.4.4 Angiogénese .....	29
2.3.4.4.1 Fatores Angiogénicos .....	29
2.3.4.4.2 Outras vias.....	29
2.3.4.5 Quimiocinas.....	30
2.3.4.6 Imunossupressão .....	30
2.3.5 Cox-2 e prognóstico .....	31
2.3.6 Inibidores da Cox-2 como agentes terapêuticos e preventivos.....	32
2.3.6.1 Terapia anti-Cox-2 em humanos .....	34
2.3.6.2 Terapia anti-Cox-2 em animais.....	35
2.3.7 Coxibs.....	37
2.3.8 Expressão da Cox-1 nas neoplasias .....	38
3. Avaliação da expressão de Cox-2 em tumores mamários da gata por imunohistoquímica (IHQ).....	39
3.1 Objetivos .....	39
3.2 Material e métodos .....	40
3.2.1 Amostras .....	40
3.2.2 Imunohistoquímica (IHQ) .....	40
3.2.3 Avaliação dos resultados obtidos pela técnica de IHQ.....	42
3.2.4 Análise estatística .....	43
3.3 Resultados .....	43
3.3.1 Caracterização da população.....	43
3.3.2 Características histológicas .....	45
3.3.3 Marcação para Cox-2 na glândula mamária não-neoplásica.....	46
3.3.4 Marcação para Cox-2 nos tumores mamários.....	46
3.3.5 Marcação para Cox-2 nas células do estroma .....	49
3.3.6 Outros parâmetros imunohistoquímicos .....	50
3.4 Discussão.....	51
3.5 Conclusão .....	54
Bibliografia .....	55
Anexo 1 – Correlação com aspetos clínico-patológicos (Clone SP21).....	79
Anexo 2 – Correlação com outros marcadores (Clone SP21). .....	81
Anexo 3 – Correlação com a sobrevivência (Clone SP21). .....	82

## Lista de figuras

Figura 1 - O papel da PGE2 na carcinogénese (adaptado de Wang e Dubois, 2006). .....	31
Figura 2 - Técnica de isolamento da área do tumor nos blocos de parafina com biótomo de 6mm.....	41
Figura 3 - Curvas de sobrevivência.....	45
Figura 4 - Glândula mamária não-neoplásica.....	46
Figura 5 - Carcinoma tubular de grau III.....	47
Figura 6 - Carcinoma anaplásico de grau III.....	48
Figura 7 - Carcinoma tubular de grau I.....	48
Figura 8 - Carcinoma tubulo-papilífero de grau I. ....	49
Figura 9 - Carcinoma anaplásico de grau III.....	50



## Lista de tabelas

Tabela 1 - Estadiamento TNM de tumores mamários felinos. ....	12
Tabela 2 - Classificação histológica dos tumores felinos segundo Misdorp et al. (1999).....	13
Tabela 3 - Determinação do grau de malignidade segundo o sistema de classificação histológica de Nottingham.....	15
Tabela 4 - Fatores envolvidos no aumento de expressão da Cox-2.....	20
Tabela 5 - Anticorpos primários e protocolos de IHQ realizados. ....	42
Tabela 6 - Classificação semi-quantitativa quanto à percentagem de células marcadas. ....	43
Tabela 7 - Classificação semi-quantitativa quanto à intensidade da marcação. ....	43
Tabela 8 - Comparação do número de mortes e níveis de expressão de Cox-2 (Clone 33). ....	44
Tabela 9 - Comparação do número de mortes e níveis de expressão de Cox-2 (Clone SP21).....	44
Tabela 10 – Classificação Histológicas dos tumores avaliados no estudo (n=21). ....	45
Tabela 11 – Níveis de expressão de Cox-2 nos tumores mamários para os dois anticorpos .....	47

## Lista de símbolos e abreviaturas

% - percentagem

°C - grau Celsius

15-PGDH – 15-Hydroxyprostaglandin dehydrogenase (15-hidroxiprostaglandina desidrogenase)

15-LOX-1 – 15-lipoxygenase-1 (15-lipoxigenase-1)

ADN – ácido desoxirribonucleico

AINEs – anti-inflamatórios não esteróides

Akt – protein Kinase B (proteína cinase B)

*Apc* – gene murino Adenomatous polyposis coli

*Apc*<sup>Δ716</sup> – modelo murino para a Polipose Adenomatosa Familiar com mutação no resíduo 716

*ApcMin* – modelo murino para a Polipose Adenomatosa Familiar com mutação no gene *Apc*,  
*Min* – multiple intestinal neoplasia

Bcl-2 – B-cell lymphoma 2

bFGF – basic fibroblast growth factor (factor de crescimento fibroblástico básico)

cPGES – PGES citosólica

cm – centímetro

Cox – cicloxigenase

Cox-1 – cicloxigenase-1

Cox-2 – cicloxigenase-2

CXCR4 – recetor de quimiocinas CXC 4

EGFR ou HER-1 – human epidermal growth factor receptor 1 (recetor para o fator de crescimento epidérmico humano tipo-1)

EMA – European Medicines Agency

EP1 – 4 – recetores para a PGE2 nos mamíferos

EUA – Estados Unidos da América

FDA – Food and Drug Administration

FeLV – feline leukemia virus (vírus da leucemia felina)

FGF – fibroblast growth factor (fator de crescimento fibroblástico)

FIV – feline immunodeficiency virus (vírus da imunodeficiência felina)

FMV – Faculdade de Medicina Veterinária

GH – growth hormone (hormona de crescimento)

H&E – Hematoxilina e Eosina

HER-2 ou ERBB2 ou NEU – human epidermal growth factor receptor 2 (recetor do fator de crescimento epidérmico humano tipo-2)

IGF-1 – insulin-like growth factor 1 (factor de crescimento semelhante à insulina tipo-1)

IHQ - imunohistoquímica

IL – interleucina

INF- $\gamma$  – interferão gama

kDa – quilo-dalton

LPS – Lipopolissacarídeos

M – metastização à distância (Sistema de classificação TNM)

MDA – malonaldeído

$\mu\text{m}$  – micrometro

MMTV – mouse mammary tumor virus (vírus do tumor mamário murino)

mPGES-1 e 2 – PGES microssomais 1 e 2

N – linfonodos regionais (Sistema de classificação TNM)

N= – número de casos

NF $\kappa$ B – nuclear factor kappa B (fator nuclear kappa B)

NK – linfócitos Natural Killer

OMS – Organização Mundial de Saúde

OVH – Ovariohisterectomia

p53 – proteína citoplasmática com 53 kDa de massa molecular

PAAF– Punção Aspirativa com Agulha Fina

PDGF – platelet derived growth factor (fator de crescimento derivado das plaquetas)

PGE2 – prostaglandina E2

PGES – PGE-sintetase

PGG2 – prostaglandina G2

pH – potencial de hidrogénio

PGH2 – prostaglandina H2

PGI2 – prostaciclina

PI3k – phosphoinositide 3-kinase (fosfoinosítídeo 3-cinase)

PPAR $\delta$  – peroxisome proliferator-activated receptor  $\delta$  (recetor ativado  $\delta$  por proliferadores peroxissomais)

PPAR $\beta$  – peroxisome proliferator-activated receptor  $\beta$  (recetor ativado  $\beta$  por proliferadores peroxissomais)

*PTEN* – phosphatase and tensin homolog (gene da fosfatase e da tensina homóloga)

RE – recetor de estrogénio

RD-114 – retrovírus endógeno felino

RP – recetor de progesterona

SID – *semel in die* (uma vez por dia)

T – tamanho da neoplasia primária (Sistema de classificação TNM)

T4 – tetriodotironina ou tiroxina

TGF – transforming growth factor (fator de crescimento tumoral)

TGF- $\beta$  – transforming growth factor  $\beta$  (fator de transformação do crescimento  $\beta$ )

Th1 – linfócito T helper 1 (linfócito T auxiliar 1)

Th2 – linfócito T helper 2 (linfócito T auxiliar 2)

<sup>TM</sup> - trademark (marca registada)

TNF-A – tumor necrosis factor alpha (factor de necrose tumoral alfa)

TNM –Tumour, Node, Metastasis (Tumor, Linfonodo, Metástases)

TXA2 – tromboxano A2

UTL – Universidade Técnica de Lisboa

VEGF – vascular endothelial growth factor (fator de crescimento do endotélio vascular)

W – watt

## **1. Descrição das atividades do estágio**

As atividades do estágio curricular foram, na sua maioria, realizadas no Laboratório de Anatomia Patológica da Faculdade de Medicina Veterinária. Diversas amostras de tumores mamários felinos foram avaliadas e selecionadas. Posteriormente, foram submetidas a diversas técnicas de imunohistoquímica recorrendo a dois anticorpos diferentes, seguindo-se a sua observação e a análise de resultados. Os resultados obtidos foram posteriormente correlacionados com diversos parâmetros clinicopatológicos e imunohistoquímicos.

Foi ainda possível apresentar aos colegas de laboratório as bases para a realização do presente estudo, assim como assistir a apresentações de outros projetos a decorrerem em paralelo nesta área de investigação.

Os resultados deste estudo foram apresentados no IX Congresso do Hospital Veterinário Montenegro (comunicação oral) e foi elaborado um poster apresentado no Congresso da European Society of Veterinary Oncology, em Lisboa, em Maio de 2013.

## **2. Revisão bibliográfica**

### **2.1 Introdução**

O estudo das neoplasias mamárias na gata, e também na cadela, tem mostrado grande importância devido às semelhanças que estas lesões apresentam com o cancro da mama da mulher, tornando-as espécies animais de interesse para estudos de oncologia comparada (Peleteiro, 1994). Adicionalmente, o facto deste tipo de neoplasia ser bastante frequente na prática clínica também ajudou a que o seu estudo ganhasse maior destaque (Peleteiro, 1994).

Os tumores mamários felinos apresentam elevado grau de malignidade e, clinicamente, são muito agressivos (Soremno, 2011), apresentando um prognóstico quase sempre muito reservado (Lana, Rutteman & Withrow, 2007). Nas últimas décadas poucos progressos foram conseguidos no que toca ao aumento do período de sobrevivência dos felinos com este tipo de neoplasia, sendo o diagnóstico precoce e o tratamento agressivo essenciais (Lana et al., 2007). Deste modo, é imperativo encontrar novas formas de diagnóstico e de terapêutica de forma a melhorar o mau prognóstico normalmente associado aos tumores mamários felinos.

Uma eventual abordagem terapêutica poderá ser a utilização de fármacos inibidores da ciclooxigenase-2 (Cox-2). A Cox-2 é uma enzima que se encontra sobreexpressa em várias neoplasias humanas (Buckman et al., 1998; Hwang, Scollard, Byrne & Levine, 1998; Wolff et al., 1998; Chan et al., 1999; Mohammed et al., 1999; Tucker et al., 1999; Gupta, Srivastava,

Ahmad, Bostwick & Mukhtar, 2000; Maaser et al., 2003). No cancro da mama os elevados níveis de expressão desta enzima estão associados a formas clínicas mais agressivas e a pior prognóstico (Ristimaki et al., 2002). Adicionalmente, vários ensaios clínicos mostraram diminuição do risco de desenvolvimento de cancro da mama com a administração preventiva de fármacos anti-Cox-2 sugerindo um papel desta enzima nos mecanismos oncogénicos (Sharpe et al., 2000; Harris, Beebe-Donk & Alshafie, 2006; Holmes et al., 2010; Ashok, Dash, Rohan, Sprafka & Terry, 2011). Em medicina veterinária, existem também trabalhos que sugerem o envolvimento da COX-2 na carcinogénese mamária na gata, assim como a sua correlação com menor tempo de sobrevivência (Millanta et al., 2006; Sayasith, Sirois & Doré, 2009).

## **2.2 Neoplasias mamárias na gata**

### **2.2.1 Anatomia e histologia da glândula mamária**

A gata possui oito glândulas mamárias, dispostas em duas filas, desde a região torácica até à região inguinal (Barone, 1996). Estas são designadas, no sentido antero-posterior de: torácicas, abdominais anteriores, abdominais posteriores e inguinais (Peleteiro, 1994). Outros autores atribuem nomenclatura diferente: torácica cranial, torácica caudal, abdominal cranial, abdominal caudal (Tyler, 2002; Raharison & Sautet, 2006). Raharison e Sautet (2006) referem ainda um quinto par de glândulas, as inguinais, que são muito rudimentares quando estão presentes.

Quanto à circulação linfática, as glândulas mamárias torácicas e abdominais anteriores (ou torácicas craniais e caudais) homolaterais drenam para o centro linfático axilar, enquanto as glândulas abdominais posteriores e inguinais (abdominais craniais e caudais), drenam para o centro linfático inguinal superficial (Saar & Getty, 1986). É de salientar que existem anastomoses entre as glândulas homolaterais, mas não entre as duas cadeias mamárias, esquerda e direita (Peleteiro, 1994).

Em 2006, Raharison e Sautet demonstraram que tanto a glândula abdominal anterior como a abdominal posterior (torácica caudal e abdominal cranial) drenam em ambas as direções, ou seja, para os centros linfáticos axilar e inguinal, ao contrário daquilo que se pensava. Ainda neste estudo, não foi observada qualquer anastomose entre glândulas mamárias, nem mesmo entre as homolaterais.

As glândulas mamárias são glândulas apócrinas modificadas. Cada unidade glândular forma um lobo (Burkitt, Young & Heath, 1993) e cada um destes lobos é constituído por uma glândula túbulo-alveolar composta (Burkitt et al, 1993; Junqueira & Carneiro, 2004). Estes lobos são envolvidos por tecido adiposo que é subdividido por septos de tecido conjuntivo

(Burkitt et al, 1994). Este tecido conjuntivo, denso e com baixa quantidade de células (Burkitt et al, 1994; Junqueira e Carneiro, 2004), divide cada lobo em diversos lóbulos mamários que apresentam um sistema de ductos, chamados genericamente de ductos intralobulares. É a partir destas estruturas que se desenvolvem os alvéolos secretores (Burkitt et al, 1994). O tecido conjuntivo intralobular é menos denso, mais celular e muito vascularizado (Burkitt et al, 1994; Monteiro-Riviere, Stinson & Calhoun, 1994; Junqueira e Carneiro, 2004).

O sistema de ductos inicia-se nos chamados ductos intralobulares que drenam para o ducto lobular (Monteiro-Riviere et al., 1994). Estes ductos lobulares, por sua vez, drenam nos chamados ductos lactíferos, de maior calibre, que se abrem, independentemente, no mamilo, após a formação de uma dilatação chamada seio lactífero (Peleteiro, 1994). Cada mama da gata possui entre 4 a 7 ductos lactíferos (Monteiro-Riviere et al., 1994).

Enquanto os ductos de maior calibre são revestidos por uma fileira dupla de células epiteliais cúbicas ou cilíndricas baixas (Burkitt et al, 1994; Peleteiro, 1994), os ductos menores são apenas revestidos por uma camada epitelial simples (Burkitt et al, 1994; Monteiro-Riviere et al., 1994; Peleteiro, 1994) que apresenta células mioepiteliais fusiformes à periferia (Monteiro-Riviere et al., 1994). Os alvéolos secretores são também revestidos por um epitélio cúbico, cuja espessura varia com a atividade secretora (Monteiro-Riviere et al., 1994).

### **2.2.2 Epidemiologia**

As neoplasias mamárias correspondem a cerca de 12% do total de tumores da espécie felina e a 17% dos tumores na gata (Dorn, Taylor, Schneider, Hibbard & Klauber, 1968<sup>1</sup>, citados por Misdorp, 2002). São a terceira neoplasia mais comum no gato, após os tumores cutâneos e os linfomas e, ainda que não sejam tão comuns como na espécie canina e humana (Lana et al., 2007), apresentam uma elevada malignidade e são clinicamente muito agressivos (Sorenmo, 2011). Na gata, ao contrário da cadela, prevalecem os tumores malignos (Peleteiro, 1994).

Os tumores mamários atingem principalmente gatas de meia idade ou de idade mais avançada, estando a média situada entre os 10 e os 12 anos (Hayes & Mooney, 1985<sup>2</sup>, citados por Sorenmo, 2011). Existem, no entanto, relatos de gatas com tumores mamários entre os 6 meses e os 20 anos de idade (Peleteiro, 1994). É importante salientar que as lesões benignas são mais comuns em gatas jovens (Peleteiro, 1994; Sorenmo, 2011), por exemplo, a chamada fibroadenomatose mamária felina que se caracteriza por uma proliferação acelerada do estroma e epitélio ductal (Misdorp, Else, Hellmen & Lipscomb, 1999), sendo a mais frequente. Esta lesão também ocorre com alguma frequência nos

---

<sup>1</sup> Dorn, C.R., Taylor, D.O., Frye, F.L. & Hibbard, H.H. (1968). Survey of animal neoplasms in Alameda and Contra Costa Counties, California. I. Methodology and description of cases. *Journal of the National Cancer Institute*, 40(2), 295-305.

<sup>2</sup> Hayes, A.A., Mooney, S. (1985). Feline mammary tumors. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 15(3), 513-520.

felinos tratados com progestagénios e em gatas gestantes, estando a mesma associada a níveis elevados de progesterona exógena e/ou endógena (Hayden, Barnes & Johnson, 1989; Hayden, Johnston, Kiang, Johnson & Barnes, 1981; Misdorp et al., 1999).

Foram publicados vários estudos que indicam a existência de predisposição rácica (Siameses) para o desenvolvimento de neoplasias mamárias (Dorn et al., 1968, citados por Soremno, 2011), mas, segundo Peleteiro (1994), não é seguro fazer-se tal afirmação sem saber a proporção de raças felinas. Os tumores mamários felinos em machos são, maioritariamente, diagnosticados em indivíduos castrados (Cotard, 1975<sup>3</sup> citado por Peleteiro, 1994) ou submetidos à administração de progestagénios (Skorupski et al., 2005). Skorupski et al. (2005) referem ainda que a idade média do aparecimento desta neoplasia nos felinos machos é de 12,5 anos.

### **2.2.3 Características macroscópicas**

Os tumores mamários nos pequenos animais apresentam-se geralmente sob a forma de nódulos (Misdorp, 2002), normalmente bem circunscritos e raramente com mais de 8 cm na espécie felina (Peleteiro, 1994). Podem ser quísticos, o que ocorre mais frequentemente na cadela e, por vezes, podem apresentar-se como massas nodulares densas sob forma de placas (Peleteiro, 1994). A ulceração da massa tumoral é comum na gata (Peleteiro, 1994; Lana et al., 2007) e a superfície de corte pode apresentar necrose e calcificação (Peleteiro, 1994).

No que toca a mobilidade da(s) massa(s) tumoral(is), esta é variável, com aderência de alguns tumores à pele e mesmo ao músculo (Peleteiro, 1994; Lana et al., 2007). Este tipo de neoplasia é geralmente acompanhada de reação inflamatória (Peleteiro, 1994). Os chamados carcinomas inflamatórios foram, inicialmente, descritos na espécie humana e na espécie canina estando associados a mau prognóstico (Pérez-Alenza, Jiménez, Nieto & Peña, 2004). Este tipo de carcinoma é caracterizado por sinais semelhantes aos de um processo inflamatório, observando-se rubor e calor, sendo o diagnóstico confirmado após o exame histopatológico que revela infiltração neoplásica dos vasos linfáticos da derme (Pérez-Alenza et al., 2004). No entanto, alguns casos podem apenas apresentar, separadamente, sinais clínicos ou as características histopatológicas (Bonnier et al., 1995). É ainda importante referir que este tipo de carcinoma pode ser primário, se não existir nenhum tumor mamário prévio, ou secundário, podendo este ser pós-cirúrgico ou não (Bonnier et al., 1995). Os primeiros 3 casos em felinos foram descritos por Pérez-Alenza et al. (2004), tratando-se todos de carcinomas inflamatórios secundários pós-cirúrgicos.

---

<sup>3</sup> Cotard, M.P. (1975). Contribution pour l'étude des tumeurs mammaires dans l'espèce feline. Thèse pour le Doctorat Vétérinaire, Maisons-Alfort: École Nationale Veterinaire D'Alfort.



A existência de tumores mamários múltiplos na gata é frequente, podendo apresentar igual ou diferente tipo histopatológico (Misdorp, 2002; Misdorp et al., 1999), afetando uma ou várias glândulas (Peleteiro, 1994; Misdorp, 2002). É importante atender ao facto de que os tumores múltiplos podem significar a existência de um processo multicêntrico, em consequência, ou não, da disseminação da lesão primária através da circulação linfática (Peleteiro, 1994).

Segundo Peleteiro (1994), as glândulas mamárias torácicas são as mais afetadas na gata. Num estudo realizado por Viste, Myers, Singh e Simko (2002), a localização das massas tumorais foi predominantemente cranial, mas também inguinal. Em dois outros estudos verificou-se que as neoplasias mamárias apresentavam, maioritariamente, uma localização caudal: 40/67 num estudo (Novosad et al., 2006) e 16/23 noutra (Borrego, Cartagena & Engel, 2009). Pelo contrário, Lana et al. (2007) citam diversos estudos que apontam para os tumores poderem surgir em qualquer uma das glândulas mamárias sem que exista qualquer tipo de predominância.

Os tumores mamários felinos apresentam normalmente uma taxa de crescimento elevada, bem como um elevado potencial de metastização (Lana et al., 2007), tendo como locais de metastização mais comuns os linfonodos, os pulmões e a pleura (Peleteiro, 1994). No entanto, existem relatos de metastização no fígado, baço, suprarrenais, rins, diafragma, pele, encéfalo e esqueleto (Peleteiro, 1994; Novosad et al., 2006).

## **2.2.4 Etiologia**

### **2.2.4.1 Factores hormonais**

A glândula mamária normal possui recetores de estrogénios (RE) e de progesterona (RP), através dos quais as hormonas sexuais modulam o crescimento e/ou o desenvolvimento da glândula mamária durante a puberdade, a gravidez e o ciclo éstrico (Murphy, 2009). Tal como nos humanos, as hormonas ováricas estão envolvidas no desenvolvimento de neoplasias mamárias, tanto nos cães como nos gatos (Millanta et al., 2005a).

Existem evidências claras do efeito protetor da ovário-histerectomia (OVH) precoce em felinos (Misdorp, Romijn & Hart, 1991), sendo o risco de desenvolvimento de neoplasias mamárias 7 vezes maior em fêmeas inteiras (Brodey, 1970<sup>4</sup>, citado por Peleteiro, 1994), o que é sugestivo de uma etiologia hormonal no desenvolvimento deste tipo de tumores. O efeito protetor pela OVH diminui drasticamente nos primeiros anos de vida: se for realizada antes dos 6 meses temos uma redução de 91%, dos 7 aos 12 meses de 86% e de apenas

---

<sup>4</sup> Brodey, R.S. (1970). Canine and Feline Neoplasia. *Advances in Veterinary Science and Comparative Medicine*, 14, 309-354.

11% se a OVH for realizada entre os 13 e os 24 meses (Overley, Shofer, Goldschmidt, Sherer & Sorenmo, 2005).

Adicionalmente, a administração de progestagénios está relacionada com o aumento do risco de desenvolvimento de neoplasias mamárias (Misdorp, 2002). As lesões mamárias benignas, principalmente a fibroadenomatose mamária felina, são mais comuns nestes casos (Misdorp et al., 1991), tendo os progestagénios endógenos e os circulantes durante a gravidez, um efeito oncogénico semelhante (Hayden, Johnston, Kiang, Johnson & Barnes, 1981; Misdorp et al., 1999). Num estudo mais recente, 8 dos 22 gatos machos com neoplasias mamárias apresentavam história de uso de progestagénios (Skorupski et al., 2005). É interessante referir que nos grandes felinos em cativeiro, a maioria dos tumores mamários surge em animais medicados com estes fármacos (Munson & Moresco, 2007).

É igualmente importante salientar que a maioria dos carcinomas mamários felinos não mostra marcação para os RE, apesar de marcar frequentemente para os RP (Hamilton, Else & Forshaw, 1976<sup>5</sup> e Johnston, Hayden, Kiang, Handschin & Johnston, 1984<sup>6</sup>, citados por De las Mulas et al., 2002). Num estudo de 2000, 80,8% dos tumores felinos malignos analisados por Imunohistoquímica (IHQ) não apresentava marcação para os RE, ao contrário das lesões benignas, onde a expressão foi maior (De Las Mulas et al., 2000). Também Millanta et al. (2005a) descreveram uma redução acentuada na expressão de RE em carcinomas felinos invasivos comparativamente ao tecido mamário normal e às displasias, verificando-se o contrário no que diz respeito aos RP. Ainda neste estudo, a maioria dos carcinomas invasivos foram classificados como RE- e PR+ (27/47) ou como ER- e PR- (16/47). De las Mulas et al. (2002) também identificaram o mesmo fenómeno. No entanto, os carcinomas ER- e PR- encontravam-se em maior quantidade (13/24) face aos ER- e PR+ (6/24). Tal pode, eventualmente, encontrar explicação pelo facto da menor dimensão da amostra (De las Mula et al. 2002). Outra discrepância entre os dois estudos foi o facto de De las Mulas et al., (2002) terem demonstrado que metade dos tumores malignos RP+ era cumulativamente RE+ (4/8), ao contrário de Millanta et al. (2005a) que relatam apenas dois tumores RE+ em 29 RP+. Mais uma vez, tal pode dever-se aos tamanhos díspares da amostragem. Num outro estudo, apenas 8,5% dos carcinomas invasivos analisados eram RE+, enquanto a grande maioria (91,4%) era RP+ (Millanta, Citi, Della Santa, Porciani & Poli, 2006), o que está de acordo com a maioria dos estudos anteriores. Segundo Millanta et al. (2005a), verificou-se uma perda maior da expressão dos RE na gata, comparativamente à cadela, o que poderá explicar a maior agressividade dos tumores

---

<sup>5</sup> Hamilton, J.M., Else, R.W. & Forshaw, P. (1976). Oestrogen receptors in feline mammary carcinomas. *Veterinary Research*, 99(24), 477-479.

<sup>6</sup> Johnston, S.D., Hayden, D.W., Kiang, D.T., Handschin, B., Johnson & K.H. (1984). *American Journal of Veterinary Research*, 42(1), 30-34.

mamários felinos. Tal está de acordo com os estudos que associam a presença de RE a uma taxa de sobrevivência maior em pacientes humanos (Dunnwald, Rossing & Li, 2007).

Em conjunto, estas evidências sugerem que os carcinomas mamários felinos mostram um comportamento semelhante aos carcinomas mamários humanos não-dependentes de hormonas, enquanto os tumores mamários caninos são comparáveis aos tumores mamários humanos dependentes de hormonas (Millanta et al., 2005a). É importante salientar que a classificação RE- e RP+ dos tumores mamários humanos, comum na gata, é considerada por muitos um artefacto da técnica de IHQ nos tecidos humanos (Maleki, Shariat, Mokri & Atri, 2012).

No caso particular dos carcinomas inflamatórios, a avaliação de 3 casos mostrou que a expressão dos RP está de acordo com o descrito para os carcinomas não inflamatórios (Pérez-Alenza et al., 2004). Pelo contrário, a marcação para os RE foi positiva em todos os casos a partir da análise de tecidos *post mortem* e já com sinais clínicos característicos do carcinoma inflamatório. No entanto, um dos casos foi RE negativo nos tecidos recolhidos por biópsia, antes do desenvolvimento dos sinais clínicos, tendo ocorrido uma inversão na expressão dos RE. Segundo os autores, estes resultados podem estar relacionados com um fenótipo endócrino típico dos carcinomas inflamatórios.

A lesão fibroadenomatosa mamária felina, previamente descrita, foi também alvo de estudo no que diz respeito à expressão dos recetores hormonais. Millanta et al. (2005a) verificaram uma elevada expressão dos RP em todos os casos analisados, o que confirma o papel da progesterona na estimulação do crescimento do epitélio mamário. Ainda neste estudo, apenas uma lesão (1/8) foi positiva para RE, ao contrário do que relata um estudo prévio em que os 3 casos analisados apresentaram sobreexpressão de REs (De las Mulas et al., 2000). Apesar do tamanho da amostra poder influenciar as conclusões, os autores de ambos os estudos concordam que os RE poderão estar presentes apenas até determinado ponto da evolução deste tipo de lesão. Um estudo realizado por Ordás, Millán, De los Monteros, Reymundo & De las Mulas (2004) analisou as expressões dos RP, da hormona de crescimento (GH) e do fator de crescimento semelhante à insulina tipo I (IGF-1), neste tipo de lesões da gata. Tal estudo baseou-se no facto de o tratamento de cães com progestagénios ter dado origem a um aumento dos níveis plasmáticos de GH e de IGF-1 (Selman, Mol, Rutteman, van Garderen & Rijnberk, 1994; Selman, Mol, Rutteman & Rijnberk, 1994), o que levantou a hipótese da possível estimulação da proliferação das células epiteliais mamárias pela GH, diretamente ou através da síntese de IGF-1. Ordás et al. (2004) detetaram uma sobreexpressão de RP e GH nos 22 casos estudados e de IGF-1 em 14 gatas, o que parece confirmar a hipótese anteriormente apontada. Os autores concluem que os progestagénios podem induzir a síntese de GH, exercendo esta ação proliferativa direta e indireta através da síntese de outros fatores de crescimento como a IGF-1.

#### 2.2.4.2 Fatores genéticos

As alterações no ADN são passíveis de modificar a expressão de proteínas normais, assim como dar origem à produção de proteínas mutadas (Kusewitt & Rush, 2007).

Os proto-oncogenes por codificarem proteínas que regulam o crescimento e a diferenciação celular, podem encontrar-se sobreexpressos, promovendo o crescimento tumoral (Kusewitt & Rush, 2007). São dois os mecanismos que conduzem à sobreexpressão destes genes: a mutação e a amplificação (Kusewitt & Rush, 2007).

O recetor para o fator de crescimento da epiderme tipo 2 humano (HER-2, ou *ERBB2* ou NEU) é um proto-oncogene que codifica uma glicoproteína transmembranária (Ordás, Millán, Dios, Reymundo & de las Mulas, 2007) com atividade tirosina-cinase intrínseca e cuja sobreexpressão se encontra associada ao desenvolvimento de neoplasias (Millanta, Calandrella, Citi, Santa & Poli, 2005b). A atividade do HER-2 potencia: a motilidade celular, a replicação do ADN, a invasão celular, a modulação do ciclo celular e a diminuição da apoptose (Eccles, 2001).

Na espécie humana, a sobreexpressão do HER-2 ocorre frequentemente no cancro da mama (Carlsson et al., 2004), sendo a percentagem de neoplasias mamárias que apresenta esta característica variável de estudo para estudo, o que se pode dever à heterogeneidade dos métodos utilizados nesta avaliação (Millanta et al., 2005b). Nos humanos, a sobreexpressão do HER-2 está associada à diminuição do período de ausência de processo neoplásico identificável (Slamon et al., 1987), baseando-se a terapêutica na utilização clínica de anticorpos anti-HER-2 que atrasam o crescimento tumoral por se ligarem a este recetor (Cobleigh et al., 1999). Sabe-se que a sobreexpressão de HER-2 no cancro da mama humano apresenta uma forte correlação com a amplificação do proto-oncogene HER-2 (Simon et al., 2001).

Estudos em cadelas têm sugerido um papel ativo do HER-2 na carcinogénese mamária, com percentagens de sobreexpressão que variam entre os 17,6% e os 78,5% (Rungsipipat et al., 1999; De las Mulas, Ordás, Millán, Fernández-Soria & Cajal, 2003; Dutra, Granja, Schmitt & Cassali, 2004; Millanta et al., 2006), devido, em parte, aos diferentes métodos de avaliação utilizados e à variação da dimensão da amostra (Ordás et al., 2007).

No que toca à espécie felina, verifica-se uma grande heterogeneidade nos resultados relativos à sobreexpressão de HER-2 que variam entre os 5,5% e os 90% (De Maria et al., 2005; Millanta et al., 2005b; Winston, Craft, Scase & Bergman, 2005; Millanta et al., 2006; Ordás et al., 2007; Rasotto, Caliarì, Castagnaro, Zanetti & Zappulli, 2011). Mais uma vez, os diversos autores apontam os diferentes protocolos da técnica de imunodeteção usados e os critérios de interpretação, como os principais responsáveis pela heterogeneidade dos resultados (Rasotto, et al., 2011). Segundo Fetsch e Abati (2007), a análise da expressão de

HER-2 através de IHQ apresenta resultados muito discordantes de laboratório para laboratório.

Ao analisar a expressão de HER-2 em neoplasias felinas, Ordás et al. (2007) encontraram uma correlação estatisticamente significativa entre a sua sobreexpressão e as características de maior malignidade, como o tamanho da massa tumoral e a ausência de recetores hormonais. Os autores concluíram ainda que, ao contrário do que se verificou na espécie humana, a sobreexpressão de HER-2 nas neoplasias mamárias felinas não parece estar associada à amplificação génica (Ordás et al., 2007). Por outro lado, Millanta et al. (2005b) verificaram a existência de uma correlação positiva entre a sobreexpressão de HER-2 na gata e um tempo de sobrevivência menor. Ainda assim, os autores são da opinião que estudos em maior escala devem ser realizados, de modo a confirmar os resultados obtidos.

Adicionalmente, também a presença de mutações em genes que codificam para proteínas supressoras tumorais podem levar à expressão de formas biologicamente inativas ou de forma *wild type* (Kusewitt & Rush, 2007). Um exemplo é a p53 (Kusewitt & Rush, 2007) que inibe o ciclo celular (Murakami, Tateyama, Rungsipipat, Uchida & Yamaguchi, 2000a). As mutações no gene *P53* são frequentes em várias neoplasias humanas, incluindo o cancro da mama (Murakami et al., 2000a). Na espécie canina também já foram mapeadas múltiplas mutações neste gene (Muto et al., 2000).

Um estudo de 2000 detetou 3 carcinomas mamários felinos com sobreexpressão da proteína p53 através da técnica de IHQ, devido a uma mutação génica (n=9) (Nasir, Krasner, Argyle & Williams, 2000). Os autores referem que uma das evidências de perda de expressão desta proteína nuclear é o seu sequestro citoplasmático. Todavia, neste estudo tal não foi observado. No mesmo ano, Murakami et al. (2000a) avaliaram a expressão desta proteína em tumores mamários felinos. Cerca de 18,9 % (7/37) dos carcinomas analisados apresentaram sobreexpressão da proteína p53 mutada. De salientar que na espécie canina, quer os tumores malignos (30,6%), quer os tumores benignos (16%) apresentaram sobreexpressão da p53. Simultaneamente, surgiram evidências da acumulação desta proteína sem mutação em algumas neoplasias (Cesarman, Inghirami, Chadburn & Knowles, 1993; Rubio et al., 1993), levando a que os investigadores se questionem sobre a utilidade da técnica de IHQ, concluindo que serão necessários mais estudos baseados em técnicas moleculares, de modo a avaliar o perfil genético dos tumores mamários felinos. Outra limitação da IHQ diz respeito aos falsos negativos que podem ocorrer quando existem mutações que originam alterações conformacionais na proteína p53, passando esta a não ser reconhecida pelos anticorpos utilizados (Nasir et al., 2000). No entanto, Nasir et al. (2000) apontam uma vantagem da técnica de IHQ relativamente aos estudos moleculares por estes apenas analisarem certas regiões do gene, correndo-se o risco de não detetar algumas mutações. É de salientar que existem três relatos de mutações no gene da p53 em

neoplasias mamárias felinas, em três exões distintos, tal como ocorre em outras neoplasias felinas (Mayr, Schaffner, Kurzbauer, Reifinger & Schellander, 1995; Mayr, Reifinger & Loupal, 1998; Mayr et al., 2000).

Recentemente, estudos de IHQ detetaram percentagens distintas de positividade para a p53 em carcinomas mamários felinos: 35% (31/88) num dos estudos (Morris et al., 2008) e 13,7% (10/73) no outro (Rasotto, et al., 2011). Morris et al. (2008) encontraram níveis normais de expressão da proteína p53 na glândula mamária normal e em adenomas.

Outro supressor tumoral é o gene da fosfatase e da tensina homóloga (*PTEN*) que parece também estar implicado no desenvolvimento dos carcinomas mamários felinos (Ressel, Millanta, Caleri, Innocenti & Poli, 2009). Estes autores verificaram que 76% dos carcinomas mamários analisados apresentavam uma baixa expressão da proteína PTEN. Num estudo mais recente, foi verificada a perda de expressão em 89% dos carcinomas analisados (Maniscalco et al., 2012).

Por último, num estudo publicado em 2000 foi reportada a amplificação do gene da ciclina A em carcinomas mamários felinos (Murakami, Tateyama, Rungsipipat, Uchida & Yamaguchi, 2000b). As ciclinas são proteínas que regulam o ciclo celular (Hughes & Dobson, 2012), estando algumas delas, como a ciclina A (Bukholm, Bukholm & Nesland, 2001) e a ciclina D1 (Sutherland & Musgrove, 2004) sobreexpressas no cancro da mama em humanos. Murakami, et al. (2000a) demonstraram ainda, através de IHQ, que a ciclina A se encontra sobreexpressa em 48,6% dos carcinomas felinos analisados, sem que tenha ocorrido alteração dos níveis proteicos da ciclina D1.

#### **2.2.4.3 Outros fatores**

Inúmeros estudos em humanos e em roedores, sugerem que dietas ricas em lípidos e/ou o estado de obesidade contribuem para o aumento do risco de desenvolvimento de neoplasias mamárias (Misdorp, 2002). Uma das explicações propostas prende-se com o facto do excesso de nutrientes poder, no início da vida, provocar alterações a nível da concentração e disponibilidade das hormonas femininas (Misdorp, 2002).

Por outro lado, vários relatos de presença de proteínas virais em células de carcinomas mamários felinos têm sido publicados (Feldman & Gross, 1971). Foi verificada a presença de antigénios de FeLV e do retrovírus RD 114 em 30,6% e em 55,5% das neoplasias malignas avaliadas (Weijer, Calafat, Daams, Hageman & Misdorp, 1974<sup>7</sup>, citados por Misdorp, 2002).

---

<sup>7</sup> Weijer, K., Calafat, J., Daams, J.H., Hageman, P.C. & Misdorp W. (1974). Feline malignant mammary tumors. II. Immunologic and electron microscopic investigations into a possible viral etiology. *Journal of the National Cancer Institute*, 52(3), 673–679.

Estudos recentes demonstram a presença de sequências homólogas ao vírus do tumor mamário murino (MMTV) em carcinomas mamários felinos e caninos (Hsu et al., 2010). Alguns autores colocam ainda a possibilidade dos felinos e de outros animais se possam infectar com o vírus murino original e também transmiti-lo (Szabo, Haislip & Garry, 2005).

### **2.2.5 Diagnóstico**

As neoplasias mamárias felinas são diagnosticadas, geralmente, numa fase avançada, uma vez que os donos dos animais só as detetam quando estas atingem dimensões significativas (Moore, 2006). O crescimento rápido da lesão, a sua ulceração, a metastização regional nos linfonodos axilares, a emaciação e a dispneia são sinais que estão, a maioria das vezes, associados a processos malignos (Misdorp, 1999).

De modo a estabelecer um diagnóstico clínico precoce e rigoroso é necessária anamnese completa e exame clínico minucioso, que inclua a palpação cuidada de ambas as cadeias mamárias e dos linfonodos regionais (Peleteiro, 1994). Bergman (2007) refere que é essencial anotar as dimensões das lesões apresentadas. Deve-se também proceder à recolha de sangue e de urina de modo a realizar hemograma, as análises bioquímicas e urianálise (Moore, 2006; Bergman, 2007; Lana et al., 2007), assim como testes de FIV/FelV e a determinação dos valores de T4 (Moore, 2006; Bergman, 2007) de forma a avaliar o estado geral do animal (Lana et al., 2007). É importante referir que existem algumas síndromes para-neoplásicas associadas aos tumores mamários, nomeadamente a eosinofilia, hipoglicémia, hipercalcémia e neuropatias periféricas (Sellon, 2008).

O exame radiográfico do tórax deve ser realizado por rotina (Peleteiro, 1994; Bergman, 2007) e deve incluir as projeções ventro-dorsal, lateral esquerda e lateral direita, de forma a avaliar a presença de metástases nos pulmões, pleura e linfonodos (Lana et al., 2007). As metástases pulmonares são as mais frequentes (Moore, 2006) e, mesmo que não se confirme a sua presença, podem existir, pois é possível que possuam dimensões reduzidas ou que se encontrem cobertas por outras estruturas anatómicas (Peleteiro, 1994).

A ecografia abdominal poderá também ser realizada, uma vez que 25% dos tumores mamários felinos metastizam no abdómen (Bergman, 2007). A avaliação clínica das neoplasias mamárias deve culminar na sua classificação de acordo com o sistema TNM (Tumor, Linfonodo, Metástases), usando os critérios estabelecidos pela Organização Mundial de Saúde (OMS) (Tabela 1). É importante salientar que esta classificação apenas se aplica a carcinomas (Peleteiro, 1994).

Tabela 1 - Estadiamento TNM de tumores mamários felinos.

<b>T – Tumor Primário</b>		<b>N – Linfonodos Regionais</b>	
T1 - < 2 cm de diâmetro máximo		N1 – Sem metástases	
T2 – 2- 3 cm de diâmetro máximo		N2 – Com metástases	
T3 – > 3cm de diâmetro máximo		<b>M – Metástases à distância</b>	
		M0 – sem evidências de metástases	
		M1 – com evidências de metástases	
Estadio Evolutivo	T	N	M
I	T1	N0	M0
II	T2	N0	M0
III	T1,2	N1	M0
	T3	N0,1	M0
IV	Qualquer T	Qualquer N1	M1

Adaptado de: Lana, S.E., Rutteman, G.R & Withrow, S. J. (2009). *Tumors of the Mammary Gland*. In S.J Withrow & D.M. Vails (Eds.) Withrow & MacEwen's Small Animal Clinical Oncology (4th ed).

Relativamente ao diagnóstico definitivo, Misdorp, et al. (1999) são da opinião que o exame histopatológico é o método de eleição e que a citologia não é adequada para diferenciar neoplasias malignas de neoplasias benignas. Os autores salientam ainda que cerca de 10% dos tumores mamários na espécie canina podem ser erroneamente diagnosticados como benignos e, que esta percentagem, será bastante inferior em felinos. Bergman (2007) é da opinião que se deve começar sempre pela realização de uma Punção Aspirativa com Agulha Fina (PAAF) e de um exame citológico visto que este permitirá identificar outro tipo de lesões como, por exemplo, mastocitomas. Outros autores estão de acordo com Bergman (2007), apontando a citologia como uma técnica muito útil na diferenciação das neoplasias mamárias (Furian, Sandei, Rocha, & Lot, 2007; Lana et al., 2007).

Em medicina veterinária, o exame histopatológico acaba por ser realizado por rotina, uma vez que a cirurgia é o tratamento de eleição (Peleteiro, 1994), em especial, no caso dos felinos, onde a grande maioria dos tumores mamários são malignos tendo indicação inequívoca para remoção cirúrgica imediata (Lana et al., 2007). São exceção, os casos recidivantes em animais de idade avançada (Peleteiro, 1994).



## 2.2.6 Classificação histológica

Recentemente foi proposto um novo sistema de classificação histológica (Goldschmidt, Peña, Rasotto & Zappulli, 2011) para os tumores mamários caninos e, que acrescenta diversos subtipos à classificação anteriormente elaborada por Misdorp et al. (1999). Quanto às neoplasias mamárias felinas, talvez por estas não serem tão complexas em termos histológicos como os da cadela, nenhuma classificação mais recente foi proposta. Deste modo, os tumores estudados nesta tese serão classificados de acordo com a classificação de Misdorp et al. (1999) (Tabela 2).

Tabela 2 - Classificação histológica dos tumores felinos segundo Misdorp et al. (1999).

<b>Tumores Malignos</b>	<b>Tumores Benignos</b>
Carcinoma <i>in situ</i>	Adenomas
Carcinoma túbulo-papilífero	Adenoma simples
Carcinoma sólido	Adenoma complexo
Carcinoma cribriforme	Fibroadenoma
Carcinoma espinocelular	Fibroadenoma de baixa celularidade
Carcinoma mucinoso	Fibroadenoma de alta celularidade
Carcinossarcoma	Tumores mistos benignos
Carcinoma ou sarcoma em tumor benigno	Papiloma ductal
<b>Tumores não-classificados</b>	<b>Hiperplasias/ displasias mamárias</b>
	Hiperplasia ductal
	Hiperplasia lobular
	Hiperplasia epitelial
	Adenose
	Lesão fibroadenomatosa
	Quistos
	Ectasias ductais
	Fibrose focal (fibroesclerose)

Neste sistema de classificação, os tumores mamários da gata são divididos em quatro grupos: malignos, benignos, não-classificados e hiperplasias/displasias. No caso da cadela, as neoplasias malignas são classificadas de acordo com o seu grau de malignidade, com base em diversos estudos focados no prognóstico (Misdorp et al., 1999). Nos felinos, os diferentes tipos histológicos de carcinoma não podem ser graduados de acordo com o seu prognóstico, visto se verificar que este pouco varia sendo, em regra, uniformemente reservado com reduzidas taxas de sobrevivência após o diagnóstico.

(Misdorp et al., 1999). De salientar que nesta espécie podem ocorrer tumores mamários múltiplos do mesmo tipo histológico ou de tipos histológicos diferentes, ainda que tal seja mais comum nos canídeos (Misdorp et al., 1999). É igualmente possível existirem tumores mamários malignos compostos por dois ou mais tipos histológicos embora, mais uma vez, tal seja mais comum em cadelas (Lana et al., 2007). Caso um tumor apresente mais do que

um tipo histológico, a nomenclatura deve incluir todos os tipos encontrados, com o predominante em primeiro lugar, como por exemplo “carcinoma sólido e tubular” (Misdorp et al., 1999). Nas gatas, os tumores mamários epiteliais são os mais comuns (Moore, 2006; Bergman, 2007), correspondendo os carcinomas a mais de 80% dos tumores mamários encontrados (Rutteman & Kirpensteijn, 2003; Lana et al., 2007). Os carcinomas dos tipos tubulo-papilífero, sólido e cribriforme são os mais comuns nos felinos (Lana et al., 2007; Misdorp et al., 1999). Ainda que o carcinoma anaplásico esteja descrito por Misdorp et al. (1999) na cadela, só recentemente foi descrito um caso na gata (Soares, Correia, Simões, Peleteiro, Ferreira, comunicação pessoal, 26 de Novembro, 2012). Os sarcomas e os carcinosarcomas são raros nesta espécie (Lana et al., 2007; Misdorp et al., 1999; Rutteman & Kirpensteijn, 2003). No grupo dos tumores benignos, os adenomas e os fibroadenomas são os mais frequentes (Misdorp et al., 1999).

Quanto ao grau de malignidade, o sistema de classificação histológica de Nottingham ou sistema de Scarff-Bloom-Richardson modificado por Elston e Ellis (Tabela 3) é o mais utilizado, tendo valor prognóstico no cancro da mama humano (Elston & Ellis, 1998<sup>8</sup>, Ellis et al., 2003<sup>9</sup>, citados por Seixas, Palmeira, Pires, Bento & Lopes, 2011). Um estudo de 2011 demonstrou que, ao contrário do tipo histológico, o grau de malignidade aferido segundo o sistema de Nottingham mostra uma correlação com o prognóstico das neoplasias felinas (Seixas et al., 2011).

---

<sup>8</sup> Elston, C.W. & Ellis, I.O. (1998). Assessment of histological grade. In Elston, C.W. & Ellis, I.O. (Eds.), *Systemic Pathology – The Breast*, vol. 13 (3rd ed) (pp. 365-384). Londres, R.U.: Churchill and Livingstone.

<sup>9</sup> Ellis, I.O., Schnitt, S.J., Sastre-Garau, X., Bussolati, G., Tavassoli, F.A., Eusebi, V., Peterse, J.L., Mukai, K., Tabár, L., Jacquemier, J., Cornelisse, C.J., Sasco, A.J., Kaaks, R., Pisani, P., Golgar, D.E., Deville, P., Cleton-Jansen, M.J., Børresen-Dale, M.J., van’ t Veer, L., Sapino, A. (2003). Invasive breast carcinoma. In Tavassoli, F.A., Deville, P. (Eds.), *Pathology and Genetics of Tumours of the Breast and Female Genital Organs. World Health Organization Classification of Tumours* (pp. 13-59). Lyon, França: IARC Press.

Tabela 3 - Determinação do grau de malignidade segundo o sistema de classificação histológica de Nottingham.

Diferenciação	Pleomorfismo Nuclear	Índice Mitótico
<p><b>1 ponto:</b> &gt; 75% de área tumoral com formação de estruturas tubulares/glandulares</p> <p><b>2 pontos:</b> 10 a 75% de área tumoral com formação de estruturas tubulares/glandulares</p> <p><b>3 pontos:</b> &lt; 10% de área tumoral com formação de estruturas tubulares/glandulares</p>	<p><b>1 ponto:</b> núcleo pequeno, ou pouco aumentado relativamente às células epiteliais mamárias normais, margens regulares, cromatina nuclear uniforme, pouca variação na dimensão.</p> <p><b>2 pontos:</b> células maiores que as normais com núcleos vacuolares, de dimensão e forma variáveis e com nucléolos bem visíveis.</p> <p><b>3 pontos:</b> núcleo vacuolar, frequentemente com nucléolo proeminente, exibindo marcada variação na forma e dimensão. Podem ser ocasionalmente observadas formas nucleares muito aumentadas e bizarras.</p>	<p>Contagem em 10 campos com grande ampliação (objetiva de 40x)</p> <p><b>1 ponto:</b> ≤ 7 mitoses</p> <p><b>2 pontos:</b> 8-14 mitoses</p> <p><b>3 pontos:</b> ≥ 15 mitoses</p>
<p><b>Grau de Malignidade (soma dos pontos):</b></p> <p><b>Grau I:</b> 3-5 pontos  <b>Grau II:</b> 6 ou 7 pontos  <b>Grau III:</b> 8 ou 9 pontos</p>		

Argani, P., Cimino-Mathews, A. (2012). *Overview of Histologic Grade: Nottingham Histologic Score ("Elston Grade")*. Disponível em: <http://pathology.jhu.edu/breast/grade.php>

### 2.2.7 Tratamento

A cirurgia é o tratamento indicado para a maioria dos tumores mamários felinos (Misdorp, 2002; Lana et al, 2007) com exceção daqueles que já apresentam metástases distantes (Misdorp, 2002). Desta forma, a realização de radiografias torácicas para avaliar a presença de metástases é essencial (Misdorp, 2002), como já foi referido anteriormente.

E no entanto de salientar que a extirpação precoce e completa das lesões pode levar à cura dos animais que ainda não apresentem micrometástases (Misdorp, 2002). Na cirurgia, a remoção das glândulas e dos linfonodos inguinais deve ser simultânea devido à elevada probabilidade de migração de células neoplásicas para estes linfonodos através da circulação linfática (Misdorp, 2002). Os linfonodos axilares são normalmente removidos quando há suspeita de metástases (Misdorp, 2002), sendo a mastectomia radical o método cirúrgico de eleição nos felinos, pois reduz o risco de recidivas (MacEwen et al., 1984a<sup>10</sup>,

<sup>10</sup> MacEwen, E.G., Hayes, A.A., Harvey, H.J., Patnaik, A.K., Mooney, S. & Passe, S. (1984a). Prognostic factors for feline mammary tumors. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 185(2), 201-4.

citados por Misdorp, 2002), sem que, contudo, aumente o tempo de sobrevida (MacEwen et al., 1984a<sup>11</sup>, citados por Sorenmo, 2011). Sorenmo (2011) sugere que tal desfecho significa que a remoção das glândulas não afetadas previne o surgimento de novas lesões e que a falta de influência no período de sobrevida reflete o facto da causa de morte na maioria destes animais, ser devida à presença de metástases à distância muito precoces. De um modo geral, podemos afirmar que a mastectomia radical bilateral está associada a maior sobrevivência, seguida pela técnica da mastectomia radical unilateral e da mastectomia regional (Novosad et al., 2006).

Relativamente ao sucesso da quimioterapia, existem apenas dois estudos publicados com resultados discordantes entre si. Um estudo de 2006 mostra que os felinos submetidos a tratamentos com doxorrubicina após a cirurgia, apresentam um período de sobrevivência médio de 448 dias e um período de ausência de processo neoplásico identificável médio de 255 dias (Novosad et al., 2006). Como o estudo não possuía um grupo controlo, os autores recorreram apenas à literatura para avaliar os resultados, chegando à conclusão que os felinos com neoplasias no estadio III (classificação TNM) apresentaram um tempo de sobrevivência médio maior (416 dias) do que o descrito para os felinos no mesmo estadio e apenas submetidos a cirurgia (Novosad et al., 2006).

McNeill et al. (2009) publicaram um estudo semelhante tendo incluído um grupo controlo. Os felinos submetidos apenas a cirurgia apresentaram um período de sobrevivência médio e um período de ausência de processo neoplásico identificável médio de 1406 dias e 372 dias, respetivamente. O grupo submetido a cirurgia e a quimioterapia com doxorrubicina apresentou um período de sobrevivência médio de 848 dias e um período de ausência de processo neoplásico identificável médio de 676 dias. Analisando estes resultados podemos concluir que os animais submetidos a quimioterapia apresentaram menor tempo de sobrevivência, mas mais longo período de ausência de processo neoplásico identificável comparativamente ao grupo controlo. Os autores verificaram ainda que os felinos submetidos cumulativamente a mastectomia unilateral radical e a quimioterapia, apresentaram um período de sobrevivência maior (1998 dias) comparativamente ao grupo de animais apenas submetidos à cirurgia (414 dias) (McNeill et al., 2009).

Os autores de ambos os trabalhos estão de acordo ao afirmarem que os dois estudos apresentam falhas, sugerindo que novos estudos aleatórios e prospetivos devem ser levados a cabo de forma a determinar o real valor da quimioterapia (doxorrubicina) no tratamento do carcinoma mamário felino (Novosad et al., 2006; McNeill et al., 2009).

Como terapia de suporte, o uso de anti-eméticos nos casos em que os fármacos quimioterápicos utilizados estimulem a emese é indicado, bem como a prescrição de

---

<sup>11</sup> MacEwen, E.G., Hayes, A.A., Harvey, H.J., Patnaik, A.K., Mooney, S. & Passe, S. (1984a). Prognostic factors for feline mammary tumors. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 185(2), 201-4.

estimuladores do apetite e/ou métodos de alimentação suplementares de forma a impedir a perda de peso (Moore, 2006).

### 2.2.8 Prognóstico

Como já foi referido, a maioria das neoplasias mamárias felinas possui prognóstico muito reservado. A dimensão do tumor é um dos principais fatores de prognóstico (Novosad et al., 2006; Soremno, 2011), tendo alguns estudos mostrado que tumores com menos de 2 cm de diâmetro têm melhor prognóstico e tempo de sobrevivência, por vezes, superior a 3 anos depois de cirurgia agressiva (MacEwen et al., 1984a<sup>11</sup>; MacEwen et al., 1984b<sup>12</sup>, citados por Soremno, 2011). Segundo Novosad et al. (2006), tumores mamários com mais de 3 cm de diâmetro apresentam mau prognóstico e taxa de sobrevivência bastante reduzida. Viste et al. (2002) voltaram a concluir o mesmo para os tumores com mais de 3 cm, estando estes associados a sobrevivência média de apenas 4 a 12 meses. Estes investigadores demonstraram ainda que o tamanho da massa tumoral não apresenta valor prognóstico em tumores mamários com um diâmetro inferior a 3 cm, visto que a sobrevivência média nestes casos varia entre os 6,8 e os 54 meses (Viste et al., 2002).

Um estudo recente afirma que a invasão dos linfonodos regionais é um fator indicativo de mau prognóstico, sendo o período de sobrevivência inferior a 9 meses (Seixas et al., 2011). Novosad et al. (2006) verificaram que animais com metástases nos linfonodos apresentavam maior tempo de sobrevivência, em princípio, devido ao benefício da quimioterapia (doxorrubicina) que lhes poderá ter aumentado o período de sobrevivência.

No que toca à idade do animal, esta não parece condicionar o prognóstico (MacEwen et al., 1984b, citados por Soremno, 2011; Viste et al., 2002). No entanto, um estudo aponta para que a idade avançada seja um fator associado a um pior prognóstico (Weyer & Hart, 1983, citados por Misdorp et al., 2002).

MacEwen et al. (1984b), citados por Soremno (2011) concluíram que a raça pode interferir com o prognóstico, sendo este pior nos gatos de raça pura. Viste et al. (2002), pelo contrário não encontraram correlação estatisticamente significativa entre a raça e o tempo médio de sobrevivência.

No que diz respeito às características histopatológicas, a invasão vascular parece ser um fator de prognóstico importante, estando correlacionado com um período mais curto de ausência de processo neoplásico identificável (Novosad et al., 2006; Seixas et al., 2011), assim como o maior grau de malignidade segundo a classificação de Nottingham (Seixas et al., 2011), como referido anteriormente. Outros indicadores como um número de mitoses

---

<sup>12</sup> MacEwen, E.G., Hayes, A.A., Mooney, S., Patnaik, A.K., Harvey, H.J., Passe, S. & Hardy, W.D. Jr. (1984b). Evaluation of effect of levamisole on feline mammary cancer. *Journal of Biological Response Modifiers*, 3(5), 541-546.

elevado, a necrose tumoral extensa e a mastectomia parcial são também considerados fatores que pioram o prognóstico dos tumores mamários na gata. Simultaneamente, a presença de metástases à distância (pulmões - 76% e pleura - 40%) e a recorrência tumoral foram associadas a 61% das mortes (Weyer & Hart, 1983<sup>13</sup>, citados por Misdorp, 2002). Novosad et al. (2006) também verificaram que a localização das metástases influencia os períodos de sobrevivência e a ausência de processo neoplásico identificável. Neste trabalho foi ainda verificado que o tipo de cirurgia influencia a sobrevivência e que a classificação de estadio I (sistema TNM) está relacionada com maior período de ausência de processo neoplásico identificável (Novosad et al., 2006).

Por fim, um estudo de 2002 associou a sobreexpressão do fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) a pior prognóstico na gata (Millanta, Lazzeri, Vannozzi, Viacava & Poli, 2002), enquanto estudos apontam o mesmo para o cancro da mama na mulher (Gasparini, 2000). Como já foi referido, também se verificou que a sobreexpressão de HER-2 está correlacionada com um menor tempo de sobrevivência (Millanta et al., 2005b).

## **2.3 A Cicloxigenase-2 e as neoplasias mamárias felinas**

### **2.3.1 As cicloxigenases (Cox)**

A cicloxigenase (Cox) é uma enzima que converte o ácido araquidónico em prostaglandinas (Stack & DuBois, 2001). O ácido araquidónico é um ácido gordo insaturado com origem na dieta e/ou a partir do ácido linoleico presente na camada bi-lipídica das células dos mamíferos (Eberhart & DuBois, 1995; Krause & DuBois, 2000). As prostaglandinas são metabolitos de cadeia curta que estão envolvidos em diversos processos fisiológicos, assim como em mecanismos patológicos como, por exemplo, na carcinogénese (Doré, 2010).

Mais concretamente, o ácido araquidónico é convertido na prostaglandina E2 (PGE2) pela Cox, um processo que ocorre em dois passos, dada a natureza bi-funcional desta enzima (Eberhart & DuBois, 1995). Inicialmente, a Cox converte o ácido araquidónico na prostaglandina G2 (PGG2), para depois a transformar em PGH2 (Smith, DeWitt & Garavito, 2000). A PGH2 é, em seguida, convertida nos diversos prostanóides pelas prostaglandina-sintetases específicas (Smith et al., 2000) cujo tipo depende da célula/tecido em questão (Schafer, 1995). Estes prostanóides atuam de forma autócrina e parácrina junto aos respetivos recetores específicos, participando em processos biológicos diferenciados como o desenvolvimento embrionário do rim, a reprodução, o metabolismo ósseo, a modulação da resposta imunológica e a angiogénese (Stack & DuBois, 2001).

---

<sup>13</sup> Weyer, K. & Hart, A.A.M. (1983). Prognostic factors in feline mammary carcinoma. *Journal of the National Cancer Institute*, 70, 709-716.

Existem duas isoformas da enzima Cox: a Cox-1 identificada como alvo dos anti-inflamatórios não esteroides (AINEs) em 1970 (Vane, 1971), clonada em 1988 (DeWitt & Smith, 1988; Merlie, Fagan, Mudd & Needleman, 1988; Yokoyama, Takai & Tanabe, 1988) e a Cox-2 descoberta no início da década de noventa (Simmons, Botting, Hla, 2004). Ambas catalizam a mesma reação (Zha et al, 2004), apesar do seu padrão de expressão ser muito diferente (DuBois et al., 1998; Williams, Mann & DuBois, 1999), e possuem sequências com grande homologia (domínio de ancoragem e centro catalítico), exceto no que diz respeito à isoleucina 590 do canal do substrato da Cox-1, que na Cox-2 é substituída por uma valina (Kurumbail et al, 1996). Devido a esta diferença, a isoforma Cox-2 pode metabolizar outros substratos como, por exemplo, o ácido linoleico; é também esta diferença que permitiu o desenvolvimento de inibidores seletivos para a Cox-2 (Zha et al, 2004).

Enquanto a Cox-1 é expressa na maioria dos tecidos e, é responsável pela produção de prostaglandinas envolvidas na homeostase, a Cox-2 está presente em condições fisiológicas na placenta, cérebro, rim (Doré, 2010) e vesículas seminais (Zha et al, 2004), sendo a sua expressão modulada por diversos fatores que serão descritos mais adiante. De salientar que esta isoforma é, maioritariamente, expressa em situações patológicas. Recentemente, foi descoberta uma terceira isoforma na espécie canina (Cox-3) que, inicialmente, se pensou ser o alvo do paracetamol (Chandrasekharan et al., 2002; Kis, Snipes & Busija, 2005) e sobre a qual ainda existe pouca informação.

Nas células, as Coks localizam-se na membrana citoplasmática, na superfície luminal do retículo endoplasmático e na membrana nuclear (Clària, 2003).

### **2.3.2 Ativação da Cox-2**

São vários os fatores que podem promover um aumento da expressão da Cox-2 (Tabela 4). Esta indução de expressão é de curta duração, regressando aos valores basais, caso o estímulo desapareça, em 24-48 horas (Stack & DuBois, 2001). Moléculas anti-inflamatórias biológicas como os corticoesteróides, a IL-13, a IL-10 e a IL-4 impedem a expressão da Cox-2 (Niirio et al, 1998), assim como os estrogénios (Ospina, Brevig, Krause & Duckles, 2003; Martínez et al., 2006), os anti-oxidantes e a proteína p53 (Fosslien, 2000).

Tabela 4 - Fatores envolvidos no aumento de expressão da Cox-2.

- ✓ Citoquinas pró-inflamatórias – incluindo a interleukina 1 (IL-1) e o fator de necrose tumoral alfa (TNF $\alpha$ ) (DuBois et al., 1998).
- ✓ Oncogenes *SCR* e *RAS* (Subbaramaiah et al., 1996).
- ✓ Vários agentes carcinogénicos como, por exemplo, o benzo(a)pireno presente no fumo do tabaco (Fosslien, 2000).
- ✓ Diversos fatores de crescimento - fator de transformação do crescimento beta (TGF- $\beta$ ); fator de crescimento da epiderme (EGF), fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF) e fator de crescimento fibroblástico (FGF) (DuBois et al., 1998).
- ✓ Lipopolissacarídeos (LPS) (DuBois et al., 1998).
- ✓ Agentes oxidativos (Divvela, Challa & Tagaram, 2010).

### 2.3.3 Expressão da Cox-2 nas Neoplasias

As primeiras evidências de sobreexpressão de Cox-2 nas neoplasias surgiram em humanos com cancro colo-retal (Kargman et al, 1995; Sano et al., 1995), verificando-se uma redução do risco de desenvolvimento desta neoplasia em pacientes tratados com doses baixas e regulares de aspirina (Cuzick et al., 2009).

Mais tarde, a expressão aumentada de Cox-2 foi detetada em outros tumores nos humanos, como o cancro da próstata (Gupta et al., 2000), da bexiga (Mohammed et al., 1999), da pele (Buckman et al., 1998), do pulmão (Wolff et al., 1998), do esófago (Maaser et al., 2003), do pâncreas (Tucker et al., 1999), do pescoço e da cabeça (Chan et al., 1999), e da mama (Hwang, Scollard, Byrne & Levine, 1998).

Relativamente ao cancro do esófago é interessante destacar um estudo que correlaciona a sobreexpressão da Cox-2 com mutações na proteína p53 (Biramijamal et al., 2001), situação já anteriormente discutida a propósito do seu potencial envolvimento na etiologia das neoplasias mamárias felinas.

Relativamente ao cancro da mama, as primeiras evidências de uma possível correlação positiva com a sobreexpressão da Cox-2 surgiram após alguns estudos terem detetado níveis elevados de PGE2 neste tipo de neoplasias (Tan, Privett & Goldyne, 1974; Bennett et al., 1977; Rolland, Martin, Jacquemier, Rolland & Toga 1980). Bennet et al. (1977) e Rolland et al. (1980) verificaram ainda que as pacientes com metástases possuíam níveis mais



elevados desta prostaglandina. Desde então, vários trabalhos foram realizados para aferir a importância da expressão da Cox-2 no cancro mamário, tendo-se verificado um intervalo de tumores com sobreexpressão de Cox-2 entre os 4,5 e os 85%, o que poderá ser explicado pelos anticorpos utilizados e pelas diferentes formas de analisar os resultados (Singh-Ranger, Salhab & Mokbel, 2008).

É interessante salientar que os carcinomas *in situ* apresentam, geralmente, níveis de expressão de Cox-2 elevados (Boland, Butt, Prasad, Knox & Bundred, 2004), o que segundo Half et al. (2002) pode significar que a sobreexpressão de Cox-2 é um evento precoce na carcinogénese mamária.

Denkert, Winzer e Hauptmann (2003) verificaram existir uma associação positiva entre a sobreexpressão de Cox-2 e o elevado grau de malignidade, massas tumorais de maiores dimensões, a presença de metástases nos linfonodos e a invasão vascular. Outros autores sugerem o mesmo, relativamente ao grau de malignidade e à dimensão dos tumores (Ristimaki et al., 2002; Singh-Ranger et al., 2008), assim como ao desenvolvimento de metástases à distância (Singh-Ranger et al., 2008). Ristimaki et al. (2002) observaram existir associação estatisticamente significativa entre a sobreexpressão desta enzima e a negatividade para recetores hormonais, a sobreexpressão de HER-2 e taxa proliferativa elevada. Pelo contrário, Half et al. (2002) não encontraram nenhuma relação entre a sobreexpressão de Cox-2 e os parâmetros anteriormente referidos. Contudo Nakopoulou et al. (2005)<sup>14</sup> citados por Barisik et al. (2011) observaram existir relação inversa entre o grau de malignidade e os níveis de expressão de Cox-2, tendo os carcinomas de grau I analisados revelado maior expressão desta enzima.

Em medicina veterinária e na espécie canina (a que tem mais estudos nesta área) existem evidências de que várias neoplasias podem apresentar sobreexpressão da Cox-2, entre as quais o carcinoma espinocelular (Almeida, Piché, Sirois & Doré, 2001), o carcinoma das células renais (Khan, Stanfield, Trajkovic & Knapp, 2001), o carcinoma das células de transição da bexiga (Khan, Knapp, Denicola & Harris, 1999), o carcinoma prostático (Temblar, Doré, Bochsler & Sirois, 1999), o carcinoma nasal (Borzacchiello, Paciello & Papparella, 2004), as neoplasias intestinais (McEntee, Cates & Neilsen, 2002), o carcinoma do ovário (Borzacchiello, Russo & Russo, 2006), o melanoma oral (Mohammed et al., 2004), o osteossarcoma (Mullins et al., 2004) e o carcinoma mamário (Doré, Lanthier & Sirois, 2003; Queiroga, Alves, Pires & Lopes, 2007; Pereira et al., 2009).

Nesta espécie, os carcinomas apresentam expressão elevada de Cox-2 quando comparada com os tumores mamários benignos (Doré et al., 2003). De entre os carcinomas, o

---

<sup>14</sup> Nakopoulou, L., Mylona, E., Papadaki, I., Kapranou, A., Giannopoulou, I., Markaki, S. & Keramopoulos, A. (2005). Overexpression of cyclooxygenase-2 is associated with a favorable prognostic phenotype in breast carcinoma. *Pathobiology: Journal of Immunopathology, Molecular and Cellular Biology*, 72(5), 241-249.

carcinoma anaplásico, de maior malignidade, parece ser o que apresenta expressão mais elevada de Cox-2 comparativamente aos outros tipos histológicos (Heller et al., 2005).

Millanta et al. (2006) identificaram uma forte correlação positiva entre a sobreexpressão de Cox-2, a diferenciação tumoral determinada através do Sistema de Classificação Histológica de Nottingham, a sobreexpressão de HER-2 e um período de sobrevivência menor. A sobreexpressão de Cox-2 nos tumores mamários de cadela foi também associada à expressão elevada de VEGF (Queiroga et al., 2011), a maior infiltração tumoral, a alterações nucleares mais severas e a um índice mitótico mais elevado, o que sugere malignidade mais elevada (Queiroga et al., 2010). A expressão elevada de Cox-2 em tumores mamários pouco diferenciados (Millanta et al., 2006) acompanha as observações já descritas para o cancro da mama humano (Ristimäki et al., 2002). Pereira et al. (2009) verificaram ainda que também as metástases de neoplasias mamárias podem apresentar expressão elevada de Cox-2. No que toca à correlação entre as sobreexpressões de Cox-2 e de HER-2 nos tumores mamários da cadela, esta está, também, de acordo com os achados em oncologia humana (Perrone et al., 2005; Çiriş, Bozkurt, Başpınar & Kapucuoğlu, 2011).

É ainda importante referir o facto de alguns estudos identificarem sobreexpressão da Cox-2 na glândula mamária normal (Queiroga et al., 2007; Pereira et al., 2009), com localização na membrana do polo apical, em contraste com a marcação citoplasmática encontrada nas células neoplásicas (Pereira et al., 2009). Segundo os autores de ambos os estudos, tal sugere uma possível função fisiológica da Cox-2 na glândula mamária.

No que se refere aos equinos, o carcinoma espinocelular é o mais estudado relativamente à expressão de Cox-2. Vários tipos de carcinomas espinocelulares foram avaliados, como o conjuntival, o vulvar, o prepucial e o peniano (Elce, Orsini & Blikslager, 2007). Todos estes apresentavam expressão da Cox-2, mas apenas o carcinoma prepucial mostrou sobreexpressão de Cox-2 relativamente ao tecido normal (Elce et al., 2007). Um outro estudo que incidiu sobre carcinomas espinocelulares com as mesmas localizações anteriormente referidas, verificou que a maioria dos casos apresentava marcação para Cox-2, assim como as metástases dos mesmos, ainda que em menor escala (Thamm, Ehrhart, Charles & Elce, 2008).

Ainda relativamente aos carcinomas espinocelulares oculares, segundo McInnis, Giuliano, Johnson e Turk (2007), apenas os localizados na córnea apresentam sobreexpressão de Cox-2. Noutro estudo, sobre o mesmo tipo de tumores com a mesma localização, foi observada sobreexpressão de Cox-2 em menos de 10% das células neoplásicas (Rassnick & Njaa, 2007). Um estudo sobre melanomas equinos mostrou positividade para a Cox-2, ao contrário dos sarcoides (Thamm et al., 2008).

Quanto às neoplasias mamárias, foram analisados apenas 4 carcinomas em equinos, tendo um deles apresentado marcação específica para a Cox-2, assim como as suas metástases (Jottini, Cantoni, Muzzoni, Reppas & Corradi, 2009).

Relativamente à espécie felina, mais uma vez, os estudos que avaliam os níveis de Cox-2 são escassos. Existem, no entanto, algumas evidências da sobreexpressão de Cox-2 em algumas neoplasias felinas, nomeadamente, no carcinoma de células de transição da bexiga (Beam, Rassnick, Moore & McDonough, 2003), no carcinoma espinocelular oral (Beam et al., 2003; Hayes et al., 2006; DiBernardi et al., 2007), no carcinoma pancreático (Newman & Mrkonjich, 2006), no carcinoma do endométrio (Costa et al., 2008), no carcinoma espinocelular cutâneo (Bardagi, Fondevila & Ferrer, 2012) e no carcinoma mamário (Millanta et al., 2006; Sayasith et al., 2009). Pelo contrário, algumas neoplasias como o carcinoma pulmonar, o carcinoma intestinal, o linfoma nasal e entérico e o sarcoma associado à vacinação não parecem apresentar níveis aumentados de Cox-2 sendo, no entanto, importante salientar que as amostragens eram pequenas, variando entre os 6 e os 10 casos (Beam et al., 2003).

Uma das neoplasias mais investigada no gato, o carcinoma espinocelular oral, apresentou sobreexpressão de Cox-2 entre 9 a 82% dos casos (Beam et al., 2003; Hayes et al., 2006; DiBernardi et al., 2007). É importante referir que o número de casos estudados nos vários trabalhos era diverso e que os autores que obtiveram apenas 9% de casos positivos analisaram 21 tumores (Beam et al., 2003), ao passo que as amostras dos outros estudos foram mais representativas, com 55 e 34 casos (Hayes et al., 2006; DiBernardi et al., 2007). Outro pormenor que não deverá ser negligenciado é a forma de avaliação da expressão da Cox-2 e a percentagem mínima necessária de células com sobreexpressão para considerar o tumor positivo para a Cox-2 (limiar de positividade). DiBernardi et al. (2007) referem que 15 a 80% das células expressavam Cox-2, ao contrário dos outros dois estudos, nos quais a expressão era limitada a menos de 10% de células (Beam et al., 2003) ou com apenas dois casos apresentando 11 a 50% de células com sobreexpressão, e os restantes tumores com menos de 1% de células positivas (Hayes et al., 2006). É de sublinhar que no estudo realizado por Hayes et al. (2006), os animais foram sujeitos a medicação anti-inflamatória, o que poderá ter diminuído a expressão de Cox-2.

Bardagi et al. (2012) analisaram 27 carcinomas espinocelulares cutâneos felinos e todos apresentavam células com marcação positiva para Cox-2, possivelmente associada à inflamação. Contudo, não é referida a percentagem de células positivas encontradas. Contrariamente, Beam et al. (2003) não encontraram nenhum tumor Cox-2 positivo nos 6 carcinomas espinocelulares cutâneos avaliados, mesmo considerando como positivos tumores com uma baixa percentagem de células marcadas (<10%).

No que diz respeito aos raros carcinomas pancreáticos felinos, uma pequena amostra de casos foi analisada (n= 8), tendo sido detetada sobreexpressão de Cox-2 em apenas 2 casos de carcinomas ductais pouco diferenciados (Newman & Mrkonjich, 2006); é ainda de salientar que apenas 10% das células tumorais apresentavam positividade (Newman & Mrkonjich, 2006). Mais uma vez, devemos ter em conta a pequena dimensão da amostra na interpretação dos resultados. A mesma situação se passa no carcinoma das células de transição da bexiga, onde nos 7 casos positivos (n=19) apenas 10% das células estavam marcadas (Beam et al., 2003).

Também a amostragem de carcinomas de endométrio felino analisada por Costa et al. (2008) foi pequena, contando com 6 casos. Neste estudo, observou-se sobreexpressão de Cox-2 em menos de 25% das células, em 5 casos, e em 25-50% das células tumorais num único caso. É importante referir que quer o citoplasma, quer a totalidade da membrana celular apresentavam marcação, ao contrário das células uterinas normais, nas quais apenas a porção apical da membrana celular estava marcada.

Relativamente ao carcinoma mamário felino, Millanta et al. (2006) observaram uma expressão de Cox-2 elevada numa amostragem de 47 carcinomas, sendo 45 casos considerados positivos. Trinta e oito dos tumores avaliados como positivos mostravam mais do que 10% de células marcadas e, destes, 23 carcinomas tinham marcação em mais de 90% das células. Sayasith et al. (2009) obtiveram resultados semelhantes no que diz respeito à percentagem de tumores positivos, com 35 tumores Cox-2 positivos numa amostra de 40 carcinomas mamários. No entanto, os autores deste último trabalho consideraram como limiar de positividade o valor de 5%. Em contraste absoluto com estes dois estudos, Beam et al. (2003) não identificaram nenhum carcinoma Cox-2 positivo numa amostra de 9 tumores mamários, mesmo considerando o limiar de positividade inferior a 10%. Mais recentemente, Sousa (2010) analisou os níveis de expressão de Cox-2 numa amostra de 45 carcinomas, dos quais 34 apresentavam marcação em mais de 75% da população celular luminal.

Millanta et al. (2006) identificaram uma correlação positiva entre a sobreexpressão de Cox-2 e diversos parâmetros, nomeadamente, a sobreexpressão de RP e subexpressão de RE, o aumento da expressão de VEGF e um menor tempo de sobrevivência. Os autores concluíram que a Cox-2 deverá estar sobreexpressa em tumores com um fenótipo mais agressivo, uma vez que existe sobreexpressão da Cox-2 em tumores RE- e RP+ e que a perda da expressão dos RE é indicativa de maior agressividade (Millanta et al., 2006).

Como já foi referido anteriormente, a maior expressão de VEGF parece estar relacionada com pior prognóstico (Millanta et al., 2002) e, segundo Millanta et al. (2006) também com maior expressão de Cox-2. Os autores concluíram ainda que a sobreexpressão de Cox-2 poderá ser responsável pela promoção da angiogénese nas neoplasias mamárias felinas.

Sousa (2010) verificou existir uma correlação positiva entre o tipo histológico e a sobreexpressão de Cox-2, apresentando os carcinomas sólidos maior intensidade de marcação. O mesmo estudo relata ainda expressão membranar de Cox-2 na glândula mamária normal, assim como em metástases ganglionares.

Uma conclusão a que alguns autores chegaram prende-se com o facto de ser difícil fazer comparações entre estudos que utilizam diferentes sistemas para avaliar os resultados da IHQ, quer na identificação de células positivas e no limiar de positividade, quer em termos de intensidade e de padrões de marcação (Hayes et al., 2006). Doré (2011) também refere que os diferentes anticorpos utilizados e as diferentes concentrações deverão contribuir para a grande heterogeneidade de resultados e consequente dificuldade na comparação de estudos.

#### **2.3.4 PGE2 e a sua ação**

Pensa-se que a PGE2 seja a principal prostaglandina envolvida na carcinogénese (Wang & DuBois, 2006; Chen & Smyth, 2011) e que, para além desta, apenas o tromboxano A2 (TXA2) esteja implicado na promoção da angiogénese tumoral (Pradono et al., 2002).

Os níveis de PGE2 dependem da atividade da Cox-2 e da PGE-sintetase (PGES) que são responsáveis pela sua produção, e da 15-hidroxiprostaglandina desidrogenase (15-PGDH) responsável pela sua degradação (Wang & DuBois, 2006). É de salientar que foram identificados três isoformas de PGES, a PGES citosólica (cPGES) e as PGES microssomais 1 e 2 (mPGES-1 e 2) (Chen & Smith, 2011). A mPGES-1 é a principal isoforma responsável pela formação de PGE2 (Kamei et al., 2003) e a sua inibição está associada à supressão do crescimento tumoral em modelos murinos (Nakanishi et al., 2008). Também se sabe que em certas situações como, por exemplo, na ativação das células inflamatórias por macrófagos, ocorre um aumento coordenado dos níveis de expressão da Cox-2 e da mPGES (Murakami et al., 2000c).

Por outro lado, vários autores reportaram que a perda de função da 15-PGDH ocorre em diversas neoplasias como o carcinoma do pulmão (Ding, Tong, Liu, Moscow & Tai, 2005), os tumores do cólon (Backlund et al., 2005; Myung et al., 2006) e os tumores das células de transição da bexiga (Gee, Montoya, Khaled, Sabichi & Grossman, 2003). Adicionalmente, num modelo xenográfico de cancro do cólon, o restabelecimento dos níveis de 15-PGDH inibe o crescimento das lesões tumorais (Yan et al., 2004). Em algumas neoplasias, nomeadamente do cólon e da tiroide, a administração de AINEs aumenta a expressão da 15-PGDH (Backlund et al., 2005; Quidville et al., 2004).

Existem quatro subtipos de recetores para a PGE2 nos mamíferos (EP1, 2, 3 e 4) (Wang & DuBois, 2006; Cha & DuBois, 2007). Vários estudos foram realizados de modo a aferir qual ou quais destes recetores apresentam atividade específica e quais estão mais relacionados

com mecanismos oncogénicos. No que diz respeito aos tumores do cólon, as conclusões dos vários estudos nem sempre são concordantes. Alguns autores concluíram que os recetores EP1 e EP4 são os mais importantes na carcinogénese do cólon, com indução parcial de resistência à carcinogénese em ratinhos *knockout* para ambos os recetores (Watanabe et al., 1999; Mutoh et al., 2002). Tanto Watanabe et al. (1999) como Mutoh et al. (2002) concluíram ainda que o tratamento de ratinhos *ApcMin* com antagonistas para ambos os recetores diminui o desenvolvimento de pólipos. Os ratinhos *ApcMin* possuem uma mutação no gene *Apc*, tal como os humanos com Polipose Adenomatosa Familiar, que desenvolvem pólipos no início da idade adulta, evoluindo estes mais tarde, em cerca de 1% dos casos, para carcinoma colo-retal (Rosen, 1997<sup>15</sup>, citado por Hayes, 2007). Em contraste, Sonoshita et al. (2001) atribuem ao recetor EP2 maior importância. Segundo este autor, o cruzamento de ratinhos *ApcMin* com *knockouts* para EP2 teve como resultado a diminuição tanto no número como no tamanho dos pólipos, tal não se verificando nos *knockouts* para EP1 e EP3. Nos casos de adenocarcinoma associado ao esófago de Barrett existem evidências de sobreexpressão dos recetores EP2 e EP4 (Jiménez et al., 2010).

Nas neoplasias mamárias em ratinho infetado com o vírus do tumor mamário murino (MMTV), os recetores EP1, 2 e 4 apresentam expressão aumentada, ao contrário do recetor EP3 que se encontra subexpresso (Chang et al., 2004). Num outro estudo realizado em ratos, a administração de um antagonista do recetor EP1 provocou redução das lesões tumorais mamárias (Kawamori et al., 2001).

Com todas estas evidências, autores como Wang e Dubois (2006) afirmam que o desenvolvimento e a utilização de inibidores específicos para estes recetores pode ser uma boa alternativa aos inibidores da Cox-2. Como existem quatro recetores diferentes para a PGE2 e como estes participam em diferentes vias da transdução de sinal (Reader, Holt & Fulton, 2011), podem ser vários os mecanismos pelos quais esta prostaglandina poderá influenciar a carcinogénese. O resultado final da ação da PGE2 traduz-se num aumento da proliferação celular, na promoção da angiogénese, na inibição da apoptose, na estimulação da invasão celular e na supressão da resposta imune (Wang & DuBois, 2006). De seguida será feita uma breve descrição destas vias.

#### **2.3.4.1 EGFR e a metastização**

A Cox-2 é um importante mediador de metastização e as células neoplásicas que a expressam apresentam maior capacidade de invasão (Tsuji, Kawano & DuBois, 1997). Foi demonstrado que esta capacidade depende da transativação e da fosforilação do recetor

---

<sup>15</sup> Rosen, N. (1977). Cancers of the gastrointestinal tract. In Devita, V.T., Hellman, S. & Rosenberg, S.A. (Eds). *Cancer Principles and Practice of Oncology* (5th ed) (p.973). Filadélfia: Lippincott-Raven.

para o fator de crescimento da epiderme (EGFR ou HER-1) co-estimulada pela Cox-2 (Cha & DuBois, 2007), estando tanto o EGFR como a Cox-2 ativados na maioria das neoplasias humanas (Kelloff et al., 1996).

No carcinoma colo-retal provou-se que a PGE<sub>2</sub> é capaz de activar o EGFR e que, através da via de sinalização PI3k-Akt, ocorre um aumento da invasão e da capacidade de migração celular que favorecem a metastização (Sheng, Shao, Washington & DuBois, 2001; Buchanan, Wang, Bergiacchi & DuBois, 2003). O mecanismo de ativação do EGFR através da PGE<sub>2</sub> ainda não é totalmente conhecido (Buchanan et al., 2003; Buchanan et al., 2006). Ensaio em modelos xenográficos que combinam inibidores seletivos da Cox-2, inibidores do EGFR e um anti-sense para a proteína cinase A levaram a uma acentuada redução na proliferação e na angiogénese de células neoplásicas humanas derivadas de cólon e de mama (Tortora et al., 2003). Também em ratinhos *ApcMin* se observou diminuição da formação de pólipos com tratamento combinado (Torrance et al., 2000).

Um estudo de 2012 mostrou que a ativação da via Akt (proteína cinase B) é um fator de prognóstico negativo nos tumores mamários felinos, verificando-se que esta ativação se correlaciona com o maior grau de malignidade e com menor diferenciação tumoral, estatisticamente associada a menor período de ausência de processo neoplásico identificável (Maniscalco et al., 2012). Os autores demonstraram ainda, que nestes casos, ocorre a perda de expressão do gene supressor de tumores *PTEN*, um regulador negativo da via Akt (Maniscalco et al., 2012). A expressão de Cox-2 não foi analisada neste estudo, mas foi detetada a associação entre a sobreexpressão de HER-2 e a ativação da Akt. É de salientar que Millanta et al. (2006) não encontram correlação entre a sobreexpressão de Cox-2 e de HER-2 nos tumores mamários felinos.

#### **2.3.4.2 Inibição da apoptose**

##### **2.3.4.2.1 Recetor ativado $\delta$ por proliferadores peroxissomais (PPAR $\delta$ ) ou PPAR $\beta$**

Os PPAR participam em diversos processos como, por exemplo, na homeostase lipídica, na resposta imunológica, na proliferação celular, na apoptose e na carcinogénese (Lee, Olson & Evans, 2003). O PPAR $\delta$  apresenta uma taxa de transcrição nuclear modulada por ligandos (Wang & DuBois, 2006).

Foi demonstrado que tanto o PPAR $\delta$  como a Cox-2 estão sobreexpressos nas neoplasias colo-retais humanas (Gupta et al., 2000) e que a administração de um agonista seletivo do PPAR $\delta$  inibe a apoptose, acelerando o crescimento dos pólipos intestinais em ratinhos *ApcMin* (Gupta et al., 2004). Estudos realizados por Wang et al. (2004) mostraram que a PGE<sub>2</sub> estimula a sobrevivência celular em ratinhos *ApcMin*, mas não em ratinhos *ApcMin knockout* para PPAR $\delta$ . Tal permitiu aos autores concluir que a PGE<sub>2</sub> é responsável pela

transativação do PPAR $\delta$  com consequente estimulação da sobrevivência celular, através da via PI3k-Akt (Wang et al., 2004).

#### **2.3.4.2.2 Fatores e mediadores anti-apoptóticos: Bcl-2 e NFkB**

Tsujii & DuBois (1995) verificaram que a sobreexpressão induzida de Cox-2 em células epiteliais intestinais provoca a sobreexpressão da proteína anti-apóptotica Bcl-2 em ratinho, com consequente resistência à apoptose. Estudos posteriores estão de acordo com esta observação, concluindo que a PGE2 induz a expressão de Bcl-2 (Sheng, Shao, Morrow, Beauchamp & DuBois, 1998), assim como a atividade transcripcional do mediador anti-apóptotico NFkB (Poligone & Baldwin, 2001).

Um estudo de Song et al. (2002) demonstra que células sem expressão de Cox-2 são sensíveis à apoptose induzida pelo celecoxib, um inibidor seletivo da Cox-2. Utilizando um derivado do celecoxib que não inibe a Cox-2, foi também possível induzir a apoptose (Song et al., 2002), tendo-se levantado dúvidas de que seja apenas a inibição da Cox-2 o fator responsável pela apoptose tumoral (Zha et al., 2004).

Wang & DuBois (2006) especularam que poderá ser interessante administrar AINEs conjuntamente com quimioterapia/radioterapia visto que estas aumentam a expressão da Cox-2 e a produção de PGE2 e, consequentemente, aumentam a sobrevivência e resistência das células tumorais. Existe um estudo que indica que a terapia conjunta com Coxibs e radioterapia traz benefícios claros aos pacientes oncológicos (Davis et al., 2004).

#### **2.3.4.3 RAS e a proliferação celular**

O RAS é um oncogene sobreexpresso em diversas neoplasias humanas, responsável pela transformação, proliferação e sobrevivência celular através da ativação de uma cascata de proteína-cinases (Wang & DuBois, 2006).

Foi demonstrado que a PGE2 induz a sobreexpressão deste oncogene no cancro colo-retal, com um consequente aumento da proliferação celular (Wang, Buchanan, Wang, Dey & DuBois, 2005), sendo precisamente através do bloqueio da cascata pelo RAS que os AINEs e os Coxibs inibem a proliferação celular (Wang & DuBois, 2006). É de salientar ainda que o RAS possui também a capacidade de aumentar a expressão da Cox-2 (Subbaramaiah et al., 1996).



#### 2.3.4.4 Angiogénese

A sobreexpressão da Cox-2 está associada a mau prognóstico e ao aumento da densidade vascular nas neoplasias da mama em mulheres (Visscher, Smilanz, Drozdowicz & Wykes, 1993<sup>16</sup>, citados por Zha et al., 2004). Em ratinhos *ApcMin* Cox-2 *knockout* demonstrou-se uma redução no crescimento e na vascularização dos pólipos (Oshima et al., 1996; Chulada et al., 2000), permitindo concluir que a Cox-2 tem um papel preponderante na angiogénese tumoral.

##### 2.3.4.4.1 Fatores Angiogénicos

Os fatores angiogénicos são essenciais para o crescimento, sobrevivência e migração das células endoteliais vasculares, assim como para a formação de capilares (Iñiguez, Rodríguez, Volpert, Fresno & Redondo, 2003). Verificou-se que a sobreexpressão da Cox-2 no carcinoma colo-retal induz a expressão de fatores angiogénicos, como por exemplo: o VEGF e o fator de crescimento fibroblástico básico (bFGF) (Tsuji et al., 1998). Deste modo, ao atuarem sobre a Cox-2, os AINEs suprimem a produção destes fatores, o que inibe a proliferação, a migração e a formação de vasos sanguíneos (Tsuji et al., 1998; Masferrer et al., 2000).

Hernandez et al. (2001) verificaram que a PGE2 é capaz de reverter a ação inibidora dos AINEs no processo de angiogénese. Ratinhos *Apc*<sup>Δ716</sup> *knockout* para EP2 (modelo murino semelhante ao *ApcMin*) não apresentaram expressão de VEGF (Sonoshita et al., 2001), o que reforça ainda mais o envolvimento da PGE2 na angiogénese tumoral. Também se sabe que a expressão do VEGF é aumentada em células endoteliais por ação da PGE2 (Pai et al., 2001). A PGE2 modula ainda a expressão do recetor de quimiocinas 4 (CXCR4), um recetor induzido pelo VEGF e o bFGF, que está envolvido na formação de micro-vasos (Salcedo et al., 2003).

É de salientar que a sobreexpressão de VEGF está relacionada com um pior prognóstico (Millanta et al., 2002) e com a sobreexpressão de Cox-2 nos carcinomas mamários felinos (Millanta et al., 2006).

##### 2.3.4.4.2 Outras vias

Não é apenas através das vias/fatores anteriormente referidos que a Cox-2 influencia a angiogénese. A Cox-2 é responsável como já foi referido pela produção de diversas prostaglandinas como por exemplo o tromboxano A2 (TXA2) que, por sua vez, promove a

---

<sup>16</sup> Visscher, D.W., Smilanz, S., Drozdowicz, S. & Wykes, S.M. (1993). Prognostic significance of image morphometric microvessel enumeration in breast carcinoma. *Analytical and Quantitative Cytology and Histology*, 15(2), 88-92.

migração de células endoteliais (Daniel, Liu, Morrow, Crews & Marnett, 1999). A via das integrinas, essenciais na migração e na adesão das células endoteliais, é igualmente influenciada por esta enzima (Dormond, Foletti, Paroz & Ruegg, 2001).

#### **2.3.4.5 Quimiocinas**

Vários estudos apontam para um papel importante das quimiocinas no desenvolvimento das neoplasias (Balkwill, 2004), sendo as quimiocinas CC responsáveis pela infiltração de linfócitos e de macrófagos que se observa no cancro da mama, cérvix, ovário, gliomas e nos melanomas humanos (Balkwill & Mantovani, 2001). Foi demonstrado que a PGE2 inibe a produção destas quimiocinas por interação com o recetor EP2 (Jing, Vassiliou & Ganea, 2003; Jing, Yen & Ganea, 2004) e EP4 (Takayama et al., 2002; Jing et al., 2003).

Como já foi referido, a ativação do CXCR4 é co-estimulada pela Cox-2, resultando na formação de microvasos (Salcedo et al., 2003). A ativação deste recetor resulta na promoção da migração e da invasão de células neoplásicas do cancro da mama, bexiga e do pâncreas em humanos (Marchesi et al., 2004; Liang et al., 2005; Eisenhardt et al., 2005). É ainda importante referir que a sobreexpressão deste recetor está associada a um mau prognóstico no cancro da mama humano (Burger & Kipps, 2006) e que a sua expressão está aumentada em carcinomas mamários felinos (Ferrari et al., 2012).

#### **2.3.4.6 Imunossupressão**

A PGE2 pode ainda potenciar a evasão de células neoplásicas por modular o sistema imunitário (Wang & DuBois, 2006). Estudos têm vindo a mostrar que a PGE2 reduz a expressão das citocinas associadas à resposta imune Th1 (TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$ , IL-2) e aumenta a expressão de citocinas Th2 (IL-4, IL-10, IL-6) (Harris, Padilla, Koumas, Ray & Phipps, 2002). A PGE2 é também responsável pela inibição da atividade anti-neoplásica dos linfócitos Natural Killer (NK), dos macrófagos (Yang et al., 2003; Kalinski, 2012) e do complemento (Holla et al., 2005).

Na figura 1 podemos ver um resumo das vias pelas quais a Cox-2 atua, através da PGE2. Importa referir que a sobreexpressão de Cox-2 poderá ter efeitos independentes da sobreexpressão de PGE2 como, por exemplo, a produção de agentes mutagénicos (Howe & Dannenberg, 2003). Tais agentes, como o malonaldeído (MDA) induzem quebras de ADN que podem originar mutações, podendo estas ser responsáveis pela iniciação da carcinogénese (Cha & DuBois, 2007). Adicionalmente, já existem evidências que a Cox-2

tem a capacidade de ativar vários carcinogênios ambientais e dietéticos nos humanos (Wiese, Thompson & Kadlubar, 2001).

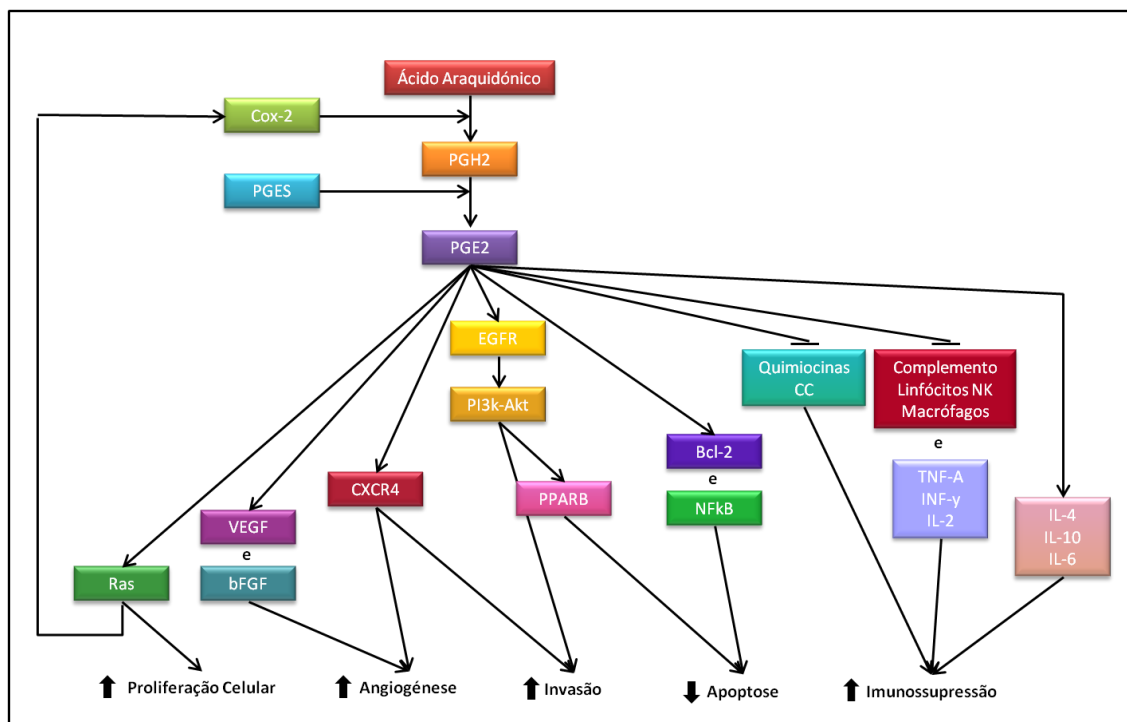


Figura 1 - O papel da PGE2 na carcinogênese (adaptado de Wang e Dubois, 2006).

Vias através das quais a PGE2 atua, aumentando a proliferação celular, a angiogênese, a invasão celular, a imunossupressão e diminuindo a apoptose.

### 2.3.5 Cox-2 e prognóstico

Diversos estudos foram realizados com o intuito de esclarecer a relevância da sobreexpressão de Cox-2 no prognóstico das neoplasias, principalmente em medicina humana. Diferentes tipos de neoplasias foram alvo de estudo, como o melanoma (Becker et al., 2009), o carcinoma espinocelular da cabeça e pescoço (Gallo et al., 2002), o cancro da próstata (Khor et al., 2007), os astrocitomas (Shono et al., 2001) e o mieloma múltiplo (Cetin et al., 2005). Em todos estes casos foi encontrada uma correlação positiva entre a sobreexpressão de Cox-2 e pior prognóstico.

Existem vários trabalhos focados no cancro do cólon, mas os resultados nem sempre têm sido concordantes. Alguns relacionam um prognóstico desfavorável com a sobreexpressão de Cox-2 (Soumaoro et al., 2004; Gustafsson et al., 2007; Ogino et al., 2008), enquanto outros não encontram qualquer tipo de relação (Wu, Gu, Ji, Li & Xu, 2003; Fux, Schwab, Thon, Gleiter & Fritz, 2005).

O mesmo acontece com o cancro da mama, com autores que associam a elevada expressão de Cox-2 a menor sobrevivência (Park et al., 2006; Zerkowski et al., 2007) e

outros que não encontraram qualquer relação (Nassar et al., 2007). Paralelamente e como já foi referido, muitos trabalhos associam a expressão de Cox-2 a diferentes parâmetros relacionados com mau prognóstico (Ristimaki et al., 2002; Denkert et al., 2003; Singh-Ranger et al., 2008), enquanto outros não encontram qualquer relação (Half et al., 2002) ou encontram até uma correlação negativa (Nakopoulou et al., 2005<sup>14</sup>, citados por Barisik et al., 2011).

Em medicina veterinária a quantidade e a qualidade dos estudos que abordam esta temática são consideravelmente inferiores. Na cadela existem evidências que associam a sobreexpressão de Cox-2 a um menor tempo de sobrevivência nos osteossarcomas (Mullins et al., 2004) e nas neoplasias mamárias (Queiroga et al., 2005; Millanta et al., 2006; Queiroga, Alves, Pires & Lopes, 2007; Lavallo, Bertagnolli, Tavares & Cassali, 2009). Tal como na medicina humana, também existem alguns autores que não encontraram qualquer correlação entre os dois parâmetros mencionados, como no caso do carcinoma prostático canino (Sorenmo, Goldschmidt, Shofer, Goldkamp & Ferracone, 2004).

Na espécie felina, os estudos são ainda mais escassos. Apenas um estudo de 2006 estabelece uma relação entre a sobreexpressão de Cox-2 em carcinomas mamários invasivos e um pior prognóstico (Millanta et al., 2006).

### **2.3.6 Inibidores da Cox-2 como agentes terapêuticos e preventivos**

Tendo em conta as evidências que implicam a Cox-2 na tumorigénese, a utilização de fármacos anti-Cox-2 na terapia e/ou prevenção das neoplasias é uma opção que poderá apresentar benefícios (Shiff, Shivaprasad & Santini, 2003).

John Vane descobriu na década de 70 que os AINEs atuam inibindo a Cox (Vane, 1971), percebendo-se mais tarde que os efeitos benéficos destes fármacos estão associados à inibição da Cox-2, enquanto que a sua toxicidade está associada aos efeitos inibitórios sobre a Cox-1 (Hayes, 2007). Comparativamente aos Humanos, as espécies felina e canina apresentam maior sensibilidade à toxicidade provocada pelos AINEs (Hayes, 2007). Tal deve-se provavelmente à deficiente glucuronidação nos felinos e à re-circulação entero-hepática nos cães (Jones & Budsberg, 2000). Ainda que existam AINEs que inibem preferencialmente a Cox-2 como o carprofeno e o meloxicam (Hayes, 2007), foram criados os Coxibs que inibem especificamente a Cox-2, não possuindo efeito inibitório sobre a Cox-1 (Hayes, 2007). No entanto, mesmo apresentando seletividade para a Cox-2, os Coxibs mostram efeitos secundários associados que serão discutidos mais adiante. É ainda importante salientar que para além destes efeitos secundários, não é desejável inibir a atividade da Cox-2 por completo, visto que esta é expressa fisiologicamente em certos órgãos como os rins e o cérebro (Jones & Budsberg, 2000).

Segundo alguns estudos, quer os AINEs, quer os Coxibs poderão exercer os seus efeitos anti-tumorais através de outras vias para além da Cox-2 (Cha & DuBois, 2006). Estes estudos demonstram que doses elevadas destes anti-inflamatórios inibem o crescimento celular e induzem a apoptose através de mecanismos independentes da Cox-2 (Kashfi & Rigas, 2005) como a 15-LOX-1 (Shureiqi et al., 2000) e o NFkB (Yamamoto, Yin, Lin & Gaynor, 1999). No que diz respeito ao cancro da mama foi demonstrado que a sulfona sulindac, um metabolito do sulindac que não inibe a Cox-2 diretamente, tem efeitos protetores neste tipo de neoplasia (Thompson et al., 1997), assim como nas neoplasias do cólon (Piazza et al., 1997). No entanto, segundo Wang & DuBois (2006) a maioria dos efeitos protetores conferidos pelos AINEs serão atingidos através da inibição da Cox-2.

Nos Coxibs foi demonstrado que o metil-celecoxib, um análogo estrutural do celecoxib sem atividade anti-Cox-2, diminui a sobrevivência celular e reduz o crescimento tumoral em modelos xenográficos de cancro do cólon, tal como o celecoxib (Schiffmann et al., 2008).

Uma outra questão importante é a correlação entre a expressão de Cox-2 e a eficácia dos inibidores. Um estudo que incidiu sobre o cancro pancreático em humanos, não encontrou nenhuma relação entre a expressão da Cox-2 e a eficácia do tratamento com celecoxib (Cascinu et al., 2007<sup>17</sup>, citados por Doré, 2010). Outro estudo, em carcinomas das células de transição da bexiga em cães, concluiu o mesmo, sendo o piroxicam o AINE utilizado (Mutsaers et al., 2005). É ainda de salientar que neste estudo também não foi encontrada correlação entre a expressão de Cox-2 e a concentração de PGE2. Quanto às neoplasias mamárias, um estudo em cadelas mostrou uma grande variação na expressão de Cox-2 (28-91%) nos tumores que responderam ao tratamento com piroxicam (Souza, Toledo-Piza, Barboza & Tobias, 2009).

Desta forma, podemos concluir que não é fácil fazer uma previsão da resposta que vamos obter no tratamento de determinada neoplasia com determinado fármaco inibidor de Cox-2, uma vez que não existe uma correlação entre os níveis de expressão de Cox-2 e a resposta ao tratamento. Podemos especular que esta situação se deve à existência de outras vias sobre as quais os fármacos anti-Cox possam atuar. Ainda assim, existem muitas evidências de que os fármacos anti-Cox-2 são uma mais-valia na prevenção e tratamento de diversos tipos de neoplasia, tanto em humanos como em animais. Em seguida será feita uma breve descrição destas evidências nas diferentes espécies.

---

<sup>17</sup> Cascinu, S., Scartozzi, M., Carbonari, G., Pierantoni, C., Verdecchia, L., Mariani, C., Squadroni, M., Antognoli, S., Silva, R.R., Giampieri, R. & Berardi, R. (2007). Cox-2 and NF-KB overexpression is common in pancreatic cancer but does not predict for Cox-2 inhibitors activity in combination with gemcitabine and oxaliplatin. *American Journal of clinical Oncology*, 30(5), 526-530.

### 2.3.6.1 Terapia anti-Cox-2 em humanos

As primeiras evidências que sugeriram um papel benéfico dos AINEs remontam a 1983 e foram obtidas através de um paciente com pólipos colo-retais que regrediram com a utilização continuada de AINEs para o controlo da dor (Waddell & Loughry, 1983<sup>18</sup>, citados por Hayes, 2007). Estudos posteriores em pacientes com Polipose Adenomatosa Familiar demonstraram que a utilização do sulindac diminuía a quantidade e o tamanho dos pólipos e induzia a sua regressão (Giardiello et al., 1996; Tonelli, Valanzano, Messerini & Ficari, 2000). O mesmo foi demonstrado num modelo animal de pólipos intestinais (Beazer-Barclay et al., 1996); verificou-se, através de vários ensaios clínicos, que o inibidor seletivo da Cox-2 celecoxib é eficaz na redução da recorrência de pólipos após polipoectomia impedindo, especialmente, o desenvolvimento de pólipos que têm maior probabilidade de progredir para cancro, ou seja, os de grande dimensão ( $\geq 1\text{cm}$ ) (Steinbach et al., 2000; Arber et al., 2006; Bertagnolli et al., 2006). Este fármaco chegou a ser utilizado clinicamente em pacientes com Polipose Adenomatosa Familiar tanto nos Estados Unidos da América, como na União Europeia, tendo esta indicação sido retirada recentemente (European Medicines Agency, 2011; Food And Drug Administration, 2012). Tanto a EMEA como a FDA decidiram retirar a indicação devido a falta de provas de eficácia no tratamento desta doença. A EMEA concluiu ainda que poderão existir alguns riscos relacionados com as elevadas dosagens normalmente administradas nestes pacientes (European Medicines Agency, 2011).

Estudos estatísticos retrospectivos e ensaios clínicos em pacientes humanos com cancro do cólon têm vindo a demonstrar que a administração regular de aspirina reduz o risco de desenvolvimento desta neoplasia (Thun, Namboodiri & Heath, 1991; Garcia-Rodriguez & Huerta-Alvarez, 2001; Flossmann & Rothwell, 2007), apesar de outros estudos, em menor número, sugerirem o contrário (Giovannucci et al., 1995).

O Celecoxib foi igualmente testado em vários modelos murinos de tumores do cólon, sendo que todos estes estudos mostraram resultados promissores, tendo-se verificado inibição do crescimento tumoral (Reddy, Rao & Seibert, 1996; Kawamori, Rao, Seibert & Reddy, 1998). Outros estudos retiram conclusões contrárias, por exemplo, num estudo de 2003, a administração de Rofecoxib em conjunto com a quimioterapia resultou na falta de eficácia e no aumento da toxicidade terapêutica no cancro do cólon (Becerra, Frenkel, Ashfaq & Gaynor, 2003).

Outras neoplasias que parecem beneficiar da utilização de AINEs, principalmente no que diz respeito à sua prevenção, são as neoplasias gástricas e esofágicas (Farrow et al., 1998), as prostáticas (Norrish, Jackson & McRae, 1998) e as da bexiga (Castelao, Gago-Dominguez, Yu & Ross, 2000). Uma revisão de oito ensaios clínicos onde a aspirina foi prescrita, revelou

---

<sup>18</sup> Waddell, W.R. & Loughry, R.W. (1983). Sulindac for polyposis of the colon. *Journal of Surgical Oncology*, 24(1), 83-87.

uma diminuição da mortalidade (independente da dose utilizada) em diversos tipos de neoplasia (Rothwell et al., 2010). Neste estudo conclui-se também que quanto maior o tempo de administração, maiores os benefícios.

A utilização de Celecoxib apresentou também resultados positivos num modelo de neoplasias cutâneas (Pentland, Schoggins, Scott, Khan & Han, 1999).

Relativamente ao cancro da mama existem igualmente evidências de que os AINEs diminuem a sua incidência (Sharpe et al., 2000). No entanto, um estudo de 2005 não mostrou qualquer tipo de associação entre a utilização esporádica de doses baixas de aspirina e a diminuição da incidência deste tipo de neoplasia (Cook et al., 2005). Recentemente, um estudo de 2010 mostrou que a utilização regular de aspirina está associada à redução da mortalidade e da recorrência (Holmes et al., 2010). É de salientar que a maioria destes estudos não indica a dose recomendada. No que diz respeito aos Coxibs, Ashok et al. (2011) relatam que a administração de Rofecoxib reduz o risco de cancro da mama em 46% e num estudo com 323 pacientes, a administração de dois inibidores da Cox-2 (Celecoxib e Rofecoxib) reduziu em 71% o risco de cancro da mama (Harris et al., 2006). Também o risco de metástases ósseas parece ser reduzido com a administração de inibidores da Cox-2 (Valsecchi, Pomerantz, Jaslow & Tester, 2009).

Ainda que existam evidências dos efeitos benéficos de vários fármacos no tratamento/prevenção de neoplasias, após uma revisão de vários estudos epidemiológicos, Cuzick et al. (2009) concluíram que a aspirina é o único AINE que de momento pode ser utilizado na prevenção de neoplasias. Os autores acrescentam ainda que são necessários mais estudos de modo a determinar a dose correta a administrar, a idade a que deve ter início a terapia e a duração da mesma (Cuzick et al., 2009).

#### **2.3.6.2 Terapia anti-Cox-2 em animais**

No que diz respeito aos felinos não existem muitos estudos sobre a utilização de AINEs no tratamento de neoplasias. Borrego et al. (2009) avaliaram, retrospectivamente, a eficácia do tratamento combinado com meloxicam, quimioterapia e cirurgia em tumores mamários felinos sem metástases pulmonares ou pleurais. Vinte e três gatas, 20 inteiras e 3 esterilizadas, foram submetidas a cirurgia de forma a remover o tumor primário e o tratamento farmacológico consistiu na administração de meloxicam por via subcutânea no dia da cirurgia (0,2mg/kg) e por via oral posteriormente à intervenção cirúrgica (0,1mg/kg SID durante 5 dias). A administração foi continuada indefinidamente a uma dose de 0,025mg/kg por via oral. A quimioterapia com doxorrubicina (1mg/kg) foi iniciada na altura de remoção da sutura. Foi administrada para além da doxorrubicina, vincristina e ciclofosfamida a uma gata esterilizada e a 13 gatas inteiras. O meloxicam foi escolhido por ser um inibidor preferencial da Cox-2, por possuir uma boa palatabilidade e por a sua metabolização ser

realizada maioritariamente por enzimas oxidativas. Alguns dos animais desenvolveram metástases, enquanto noutros casos houve recorrência ou desenvolvimento de novas lesões neoplásicas. Segundo os autores, o tratamento realizado não apresenta vantagens em relação ao tratamento cirúrgico associado à quimioterapia. É de salientar que tanto a expressão de Cox-2 como a de PGE2 não foram determinadas.

DiBernardi e Knapp (resultados não publicados) verificaram a regressão de dois carcinomas espinocelulares cutâneos felinos e o crescimento lento de um carcinoma espinocelular oral em dois gatos que tomaram piroxicam (DiBernardi et al., 2006). Os autores referem ainda que os dois gatos apresentaram um período de sobrevivência maior do que o esperado, mas que estes benefícios não se verificaram nos outros 9 felinos que fizeram parte do estudo (DiBernardi et al., 2006).

A maioria dos trabalhos publicados em veterinária tem a espécie canina como alvo de estudo, sendo o tratamento do carcinoma das células de transição da bexiga com piroxicam, o mais estudado (Doré, 2010). Foram realizados diferentes ensaios que avaliaram os efeitos do piroxicam nesta neoplasia específica. Num destes trabalhos, houve uma redução significativa do volume das lesões em 12 dos 18 casos (Knapp et al., 1994). A combinação de piroxicam com quimioterapia também teve resultados positivos, no entanto, verificou-se um aumento da toxicidade renal (Knapp et al., 2000; Henry et al., 2003). Knapp et al. (2000) concluíram que a combinação deste AINE com a cisplatina resultou num aumento da taxa de remissão, enquanto a combinação de piroxicam com a mitoxantrona resultou num maior período de sobrevivência média, em comparação com o uso isolado de cada fármaco (Henry et al., 2003).

Foram realizados muitos outros estudos em diversas neoplasias, como no carcinoma espinocelular oral (Schmidt et al., 2001; Boria et al., 2004), no melanoma oral maligno (Boria et al., 2004) e no carcinoma prostático (Sorenmo et al., 2004), sendo que em todos eles, o tratamento com piroxicam em combinação ou não com a quimioterapia apresentava vantagens em termos de sobrevivência. Contrariamente, a administração conjunta do piroxicam com doxorrubicina em cães com linfoma, não mostrou qualquer vantagem comparativamente aos animais tratados apenas com doxorrubicina (Mutsaers et al., 2002).

Um estudo realizado em 12 cadelas com carcinoma mamário inflamatório demonstrou vantagens claras do uso de inibidores da Cox-2 (Souza et al., 2009). Neste estudo, três dos animais foram submetidos a quimioterapia enquanto os restantes foram medicados apenas com piroxicam. O grupo de animais tratados com piroxicam exibiu um aumento do tempo de sobrevivência médio (171 dias), em oposição aos 14 dias observados nos três animais apenas tratados com quimioterapia. Adicionalmente, registaram-se melhorias clínicas nos animais tratados com o AINE.

No equino existe apenas o relato de um caso de carcinoma sujeito a terapia anti-Cox-2 (carcinoma espinocelular do lábio), apresentando já metastização no linfonodo regional,



onde 10-20% de células neoplásicas mostravam expressão moderada a intensa de Cox-2 (Moore et al., 2003). Depois de muitos tratamentos mal sucedidos, foi atingida a remissão completa com a administração de piroxicam *per os*.

É importante salientar que os efeitos secundários dos AINEs são particularmente relevantes no gato e no cão, em comparação com os Humanos (Hayes, 2007), como já foi referido anteriormente. Segundo Hayes (2007) é especialmente importante ter em conta os efeitos secundários em animais com mau estado geral, o que faz da monitorização clínica uma prática obrigatória, de forma a garantir a qualidade de vida ao animal. O mesmo está aconselhado para os inibidores preferenciais da Cox-2, visto que estes inibem a Cox-1 parcialmente (Hayes, 2007). Uma possível alternativa é o uso de Coxibs. Em felinos foram realizados vários estudos com o robenacoxib nos quais não foi descrito qualquer tipo de toxicidade (Giraudel et al., 2010; Kamata et al., 2012; King et al., 2011).

É de salientar, no entanto, que estes estudos não foram ainda realizados em animais com processos neoplásicos. Mesmo sem haver registo de efeitos secundários, Hayes (2007) alerta para o risco da inibição completa da Cox-2 poder interferir com alguns mecanismos fisiológicos, como já foi referido.

### **2.3.7 Coxibs**

Os Coxibs são inibidores seletivos da Cox-2 desenvolvidos para o tratamento da artrite em humanos, não apresentando os efeitos secundários associados aos AINEs (Cha & DuBois, 2006).

Um estudo desenvolvido para avaliar os efeitos dos Coxibs no sistema digestivo acabou por detetar um aumento da incidência de enfarte do miocárdio, em humanos medicados com rofecoxib (Bombardier et al., 2000). O estudo em questão possuía dois grupos, um a que foi administrado o rofecoxib e outro a que se administrou naproxeno. Inicialmente, os autores associaram os efeitos cardio-vasculares no grupo que foi tratado com o rofecoxib a uma falta de proteção conferida pelo naproxeno (Bombardier et al., 2000). Estudos posteriores vieram comprovar a associação causa-efeito verificada entre os Coxibs e os efeitos colaterais cardio-vasculares (Bresalier et al., 2005; Bertagnolli et al., 2006).

O argumento apontado pela maioria dos autores baseia-se num desequilíbrio de concentrações entre a prostaciclina (PGI<sub>2</sub>) e o tromboxano A<sub>2</sub> (TxA<sub>2</sub>) induzido pelos Coxibs (Cha & DuBois, 2006). Enquanto a PGI<sub>2</sub> inibe a agregação plaquetária e induz a vasodilatação (Murata et al., 1997), o TxA<sub>2</sub> tem o efeito contrário (Cha & DuBois, 2006); assim, a inibição da PGI<sub>2</sub> induz um estado pró-trombótico que poderá resultar num enfarte do miocárdio (Mukherjee, Nissen & Topol, 2001; FitzGerald, 2004). Adicionalmente, a PGI<sub>2</sub> parece desencadear um efeito protetor nas células cardíacas face a stress oxidativo (Adderley & FitzGerald, 1999). Cha e DuBois (2006) salientam ainda o facto de enquanto os

efeitos secundários dos Coxibs só ocorrerem alguns meses após o início do tratamento, o desequilíbrio nas concentrações de PGI<sub>2</sub> e TxA<sub>2</sub> acontece poucas horas após a administração dos inibidores. Estes autores apontam para que os Coxibs possam, eventualmente, levar a outro tipo de alterações cardiovasculares como a hipertensão e a retenção de fluidos.

Outra hipótese que poderá explicar os efeitos cardiovasculares secundários dos Coxibs é o facto destes reduzirem a expressão do VEGF, fator implicado na homeostase cardiovascular (Wang & DuBois, 2006). Tal fenómeno deve-se à subexpressão da PGE<sub>2</sub> induzida pelos fármacos que conduz à subexpressão do VEGF (Wang & DuBois, 2007).

Devido aos efeitos secundários dos Coxibs, alguns autores afirmam que o próximo passo será o desenvolvimento de novos fármacos que regulem a concentração de PGE<sub>2</sub> ou que inibam as diferentes vias ativadas por esta proteína (Wang & DuBois, 2006; Cha & DuBois, 2007). Possíveis alvos para a diminuição da concentração celular de PGE<sub>2</sub> serão as PGES, a 15-PGDH e os recetores EP 1-4 (Wang & DuBois, 2006). Em modelos murinos foi demonstrado que a deleção da mPGES-1 não provoca alterações cardiovasculares, ao contrário da inibição da Cox-2 (Cheng et al., 2006), indicando que a inibição das PGES possa ser uma estratégia viável. Wang & DuBois (2006) referem também que estes novos fármacos seriam uma grande mais-valia por poderem ser utilizados em neoplasias que apresentem sobreexpressão de qualquer uma das isoformas da Cox.

### **2.3.8 Expressão da Cox-1 nas neoplasias**

Apesar de existir um maior número de evidências a associar a sobreexpressão da Cox-2 à carcinogénese, também a Cox-1 pode estar sobreexpressa em algumas neoplasias com, por exemplo, nas neoplasias do cérvix uterino (Sales et al., 2002), do ovário (Gupta et al., 2003) e em tumores cutâneos (Tiano et al., 2002).

No cancro do ovário verificou-se que a inibição seletiva da Cox-1 diminui o crescimento tumoral em ratinhos e em modelos xenográficos (Daikoku et al., 2005), uma vez que parece haver redução da angiogénese através da não-estimulação do VEGF (Gupta et al., 2003).

Pensa-se que a sobreexpressão da Cox-1 no cancro do cólon poderá ser responsável pela formação de pólipos com dimensão até 1 mm e que a Cox-2 regule o aumento de tamanho dos mesmos a partir de 1 mm, sendo ambas as enzimas importantes no desenvolvimento deste tipo de lesão (Takeda et al., 2003).

Foi também demonstrada a sobreexpressão de Cox-1 numa percentagem importante de carcinomas espinocelulares orais humanos (Shibata et al., 2005) e do cão (Hayes et al., 2006).

### **3. Avaliação da expressão de Cox-2 em tumores mamários da gata por imunohistoquímica (IHQ)**

#### **3.1 Objetivos**

Como já foi referido anteriormente, existem poucos estudos em medicina veterinária, especialmente na gata, que incidam sobre o tema. Tendo em conta os estudos já publicados e as extrapolações feitas a partir de outras espécies, incluindo a humana, especula-se que a Cox-2 poderá ser um indicador de prognóstico e um possível alvo terapêutico nos tumores mamários felinos. Uma vez que os estudos existentes possuem sérias limitações que impossibilitam chegar a conclusões definitivas sobre a importância da Cox-2 nas neoplasias mamárias da gata, novos estudos são necessários. As limitações consistem principalmente em diferenças no processamento das amostras tecidulares, nos métodos de recuperação antigénica, nos anticorpos e respetivas concentrações, nos sistemas de classificação da expressão e nos limiares de positividade, que tornam difíceis as comparações entre estudos e retirar conclusões válidas.

Deste modo, o presente estudo teve como objetivos:

- avaliar a expressão e o padrão de marcação da Cox-2 através de dois anticorpos distintos, usando os mesmos critérios de classificação da expressão, assim como a mesma metodologia de processamento das amostras, numa amostragem de 21 tumores mamários felinos;
- correlacionar a expressão de Cox-2 com diversos aspetos clinicopatológicos, como a raça, a idade, a esterilização, a localização do tumor na cadeia mamária, o tamanho da lesão e a presença de necrose;
- avaliar a relação entre a sobreexpressão de Cox-2 e o período de sobrevivência;
- identificar se existe uma correlação entre a sobreexpressão de Cox-2 e os diferentes tipos histológicos de tumores e o seu grau de malignidade;
- comparar a expressão de Cox-2 com os níveis de expressão de HER-2, Ki67 e recetores de estrogénios e de progesterona. No caso destes últimos marcadores foram utilizados resultados obtidos nos mesmos tumores, gentilmente cedidos pela doutoranda da FMV Maria João Soares.

Procurou-se, desta forma, dar um pequeno contributo para que de futuro seja mais fácil avaliar a verdadeira importância da Cox-2 nos tumores mamários felinos e, deste modo, propôr novas estratégias terapêuticas para este tipo de neoplasia.

## 3.2 Material e métodos

### 3.2.1 Amostras

O presente estudo incidiu sobre um conjunto de 21 tumores seleccionados a partir dos casos de arquivo do Laboratório de Anatomia Patológica da FMV-UTL, obtidos nos anos de 2011 e 2012. Os critérios de exclusão foram a má preservação da amostra e a presença de extensas zonas de necrose. Todas as amostras foram processadas da mesma forma, não tendo permanecido mais do que 48h em formol tamponado após a cirurgia.

No total, as amostras que seguiram para estudo corresponderam a 15 animais, dos quais 5 tinham tumores em mais de uma glândula. Procurou-se sobretudo que a amostragem fosse representativa dos diferentes tipos histológicos de tumores na gata.

Foram observados cortes histológicos dos diversos tumores seleccionados após coloração com Hematoxilina & Eosina (H&E).

Os tumores foram classificados quanto ao tipo histológico segundo os critérios da OMS (Misdrop et al., 1999) e para atribuição do grau de malignidade foi segundo o Sistema de Classificação Histológica de Nottingham.

### 3.2.2 Imunohistoquímica (IHQ)

Para a aplicação da técnica de imunohistoquímica foram seleccionadas zonas representativas de cada um dos tumores, evitando-se as áreas de necrose e o tecido não tumoral presente nas amostras. À área seleccionada do bloco de parafina foi aplicado um instrumento perfurante (biótopo de biópsia de pele) com 6 mm de diâmetro, de forma a isolar a área do tecido que se pretendia utilizar. A perfuração do bloco não excedeu 0,5 mm (Figura 1). Posteriormente, foram efetuados cortes de 3µm de espessura num micrótomo Leica RM 2135, sendo possível colher para as lâminas de vidro apenas o corte circular de tecido isolado pelo biótopo. As áreas dos tumores seleccionadas foram montadas em lâminas adesivadas (SuperFrost™ Ultra Plus Adhesion Slides, Thermo Fisher Scientific Inc.), onde foi possível colocar três cortes para além do tecido usado como controlo positivo (ver adiante). As lâminas foram colocadas numa estufa a 64 °C durante uma 1 hora e depois numa estufa a 37°C *overnight* (aproximadamente 16 horas).

Deu-se início à imunohistoquímica, procedendo-se à desparafinação dos cortes em xilol, à sua rehidratação através da passagem por álcoois em concentrações decrescentes e, por fim, à sua lavagem em água destilada.

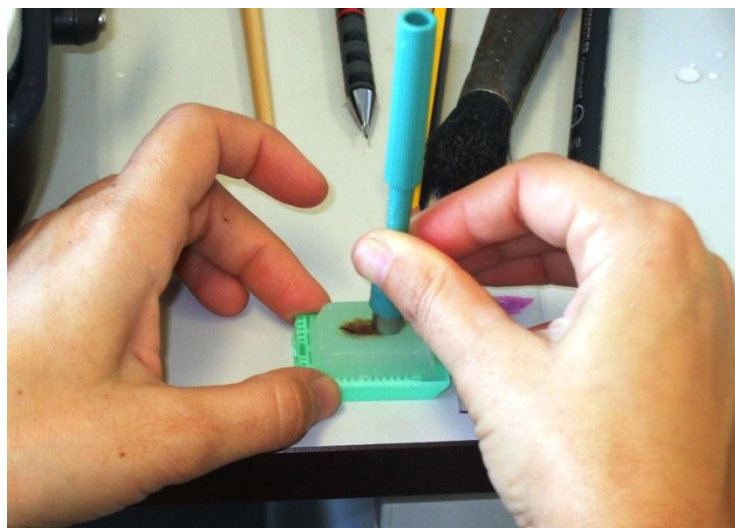


Figura 2 - Técnica de isolamento da área tumoral nos blocos de parafina com biótomo de 6mm.

A imunohistoquímica foi realizada recorrendo ao “kit” Novocastra™ Novolink™ Max Polymer Detection System (Leica Biosystems, Wetzlar, Alemanha), o qual inclui: solução de bloqueio de proteínas (*protein block*), bloqueio da peroxidase endógena (*peroxidase block*), activador da penetração do polímero (*post primary block*), o polímero (*Novolink Polymer*), o cromogénio (*Diaminobenzidine chromogen*) e o respetivo substrato (*DAB substrate buffer*).

A recuperação antigénica foi realizada em tampão citrato (pH 6) diluído a 1:10 (Novocastra Leica Epitope Retrieval Solution), recorrendo a diferentes protocolos consoante o anticorpo primário (Tabela 5). Após um período de arrefecimento de 20 minutos, foi realizada uma lavagem em PBS (Tampão fosfato salino, pH=7.2-7.4) durante 5 minutos, seguida de incubação com uma solução de bloqueio durante 5 minutos. Após duas lavagens de 5 minutos com PBS, realizou-se a incubação com um anticorpo primário anti-Cox-2, usando concentrações e tempos diferentes (Tabela 5), tendo em conta a informação descrita na literatura (Brito, 2011; Costa et al., 2009).

Após o período de incubação e duas lavagens de 5 minutos com PBS, procedeu-se ao bloqueio da peroxidase endógena. A amostra foi incubada com a solução de bloqueio durante 30 minutos. Depois de mais duas lavagens de 5 minutos com PBS, foi realizada a incubação com o bloqueio pós-primário durante 30 minutos, após os quais se realizaram novas lavagens com PBS e a incubação com o polímero durante 30 minutos. Após duas lavagens de 5 minutos iniciou-se a reação colorimétrica com a solução de trabalho DAB e o substrato respetivo, durante um período de 5 minutos, preparada segundo as instruções do fabricante, depois da qual se procedeu à lavagem com água destilada.

A contra-coloração foi feita com hematoxilina de Mayer. Por fim, procedeu-se à desidratação dos cortes com álcoois de concentrações crescentes e xilol, e à montagem com Entelan (Quick-D Mounting Medium, Klinipath, Duiven, Holanda).

Como controlo positivo utilizou-se o útero de cadela com piómetra, que mostrou expressar Cox-2 (Brito, 2011; Costa et al., 2009). Como controlo negativo, utilizou-se também útero de cadela com piómetra, substituindo-se o anticorpo primário (anti-Cox-2) por PBS.

Tabela 5 - Anticorpos primários e protocolos de IHQ realizados.

<b>Anticorpo</b>	<b>Diluição/Incubação</b>	<b>Recuperação Antigénica</b>
Clone 33, BD Pharmigen, Erembodegem, Bélgica	1:100 1 hora	Tampão citrato pH=6, Temperatura ambiente, 5 min Microondas, 700 W, 15 min
Clone SP21, Biocare Medical, Concord, CA, EUA	1:75 <i>Overnight</i> (16 horas)	Tampão citrato pH=6, Panela de pressão, 2.5 min

### 3.2.3 Avaliação dos resultados obtidos pela técnica de IHQ

Foi adotado um sistema de classificação semi-quantitativo, tendo em conta a percentagem de células neoplásicas marcadas pelo anticorpo anti-Cox-2 (Tabela 6), identificadas pela presença de coloração castanha, assim como a intensidade dessa marcação (Tabela 7).

Todos os tumores foram classificados e nos casos duvidosos foi realizada a contagem de um mínimo de 1000 células neoplásicas em 10 campos (200x).

Tabela 6 - Classificação semi-quantitativa quanto à percentagem de células marcadas.

<b>% de Células com Marcação</b>	
<10%;	0
10-25%	1
26-50%	2
51-75%	3
>75%	4

Tabela 7 - Classificação semi-quantitativa quanto à intensidade da marcação.

<b>Intensidade da Marcação</b>	
Discreta	+
Moderada	++
Intensa	+++
Muito Intensa	++++

### 3.2.4 Análise estatística

Foi utilizado o teste exato de Fisher para avaliar a existência de correlação entre a expressão de Cox-2 e a raça, a esterilização, a localização do tumor, a presença de necrose, os níveis de expressão de HER-2 e a presença de RE e RP. Foi também realizado o teste de Kruskal-Wallis de modo a comparar a expressão de Cox-2 e a média da idade, do tamanho das lesões e da expressão de Ki-67. As curvas de sobrevivência foram determinadas através do método de Kaplan-Meier. Um valor de  $p < 0,05$  foi considerado estatisticamente significativo. O software utilizado foi o PASW Statistics, versão 18, antigo SPSS Statistics (IBM Corporation, Armonk, NI, EUA).

## 3.3 Resultados

### 3.3.1 Caracterização da população

A média de idades dos 15 felinos incluídos neste estudo foi de  $13,42 \pm 3,81$  anos, com um intervalo entre os 8 e os 20 anos sendo que 53% (8/15) das fêmeas eram inteiras. No que diz respeito à raça, 87% (13/15) dos animais foram identificados como sendo domésticos de pelo curto. Os restantes animais (2/15) eram da raça Persa.

57% das lesões (12/21) localizavam-se na cadeia mamária direita, com 62% das lesões (13/21) a afetar as glândulas mamárias abdominais posteriores e inguinais. As lesões observadas apresentaram um tamanho médio de  $2,76 \pm 1,94$  cm, com um intervalo de 0,3 a 6 cm.

A sobrevivência foi definida como o período, em meses, entre o diagnóstico e o final do presente estudo ou a morte. No final do estudo, cerca de 47% (7/15) dos animais encontravam-se vivos.

Não foi identificada qualquer correlação estatisticamente significativa entre os níveis de expressão da Cox-2 detetados pelo clone SP21 e as características da população (Anexo 1).

Nas tabelas 8 e 9 é apresentada a relação entre os níveis de expressão da Cox-2 e o número de mortes, enquanto na figura 3 podemos observar as curvas de sobrevivência. Não foi encontrada qualquer correlação estatisticamente significativa entre os níveis de expressão de Cox-2 e menor período de sobrevivência com o Clone SP21 (Anexo 3).

Tabela 8 - Comparação do número de mortes e níveis de expressão de Cox-2 (Clone 33).

Níveis de Expressão de Cox-2	Nº de Casos	Nº de Mortes
0	20	10
1	1	1
2	0	-
3	0	-
4	0	-

Tabela 9 - Comparação do número de mortes e níveis de expressão de Cox-2 (Clone SP21).

Níveis de Expressão de Cox-2	Nº de Casos	Nº de Mortes
0	1	1
1	1	0
2	2	1
3	5	2
4	12	7



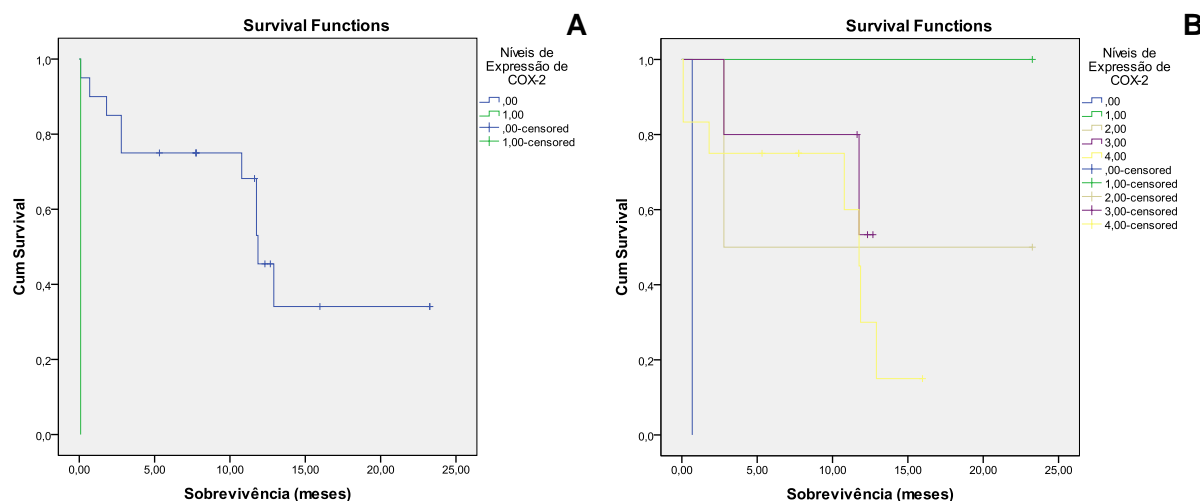


Figura 3 - Curvas de sobrevivência.

A – Clone 33; B – Clone SP21. Curvas de sobrevivência para os casos analisados segundo a classificação semi-quantitativa dos níveis de expressão de Cox-2 (0 - <10%; 1 - 10%-25%; 2 - 26-50%; 3 – 51-75%; 4 – 76-100%).

### 3.3.2 Características histológicas

Todos os tumores analisados eram malignos (Tabela 10), apresentando um grau de malignidade variável (grau I – 38%; grau II – 33%; grau III – 29%).

Ainda que os tumores com necrose extensa tenham sido excluídos do estudo, cerca de 38% (8/21) das massas avaliadas apresentavam zonas de necrose. Num caso foi ainda possível observar calcificação e 29% (6/21) dos tumores apresentavam invasão vascular.

Foi identificada uma correlação estatisticamente significativa ( $p=0,021$ ) entre os níveis de expressão de Cox-2 com o Clone SP21 e a classificação histológica segundo a OMS (Anexo 1). Nenhum dos restantes parâmetros avaliados apresentaram correlação estatisticamente significativa com os níveis de expressão de Cox-2.

Tabela 10 – Classificação Histológica dos tumores avaliados no estudo (n=21).

Classificação Histológica	Número de Casos
Carcinoma anaplásico	1
Carcinoma cribriforme	2
Carcinoma mucinoso	2
Carcinoma sólido	4
Carcinoma tubular	6
Carcinoma tubúlo-papilífero	5
Carcinoma papilífero	1

### 3.3.3 Marcação para Cox-2 na glândula mamária não-neoplásica

Em alguns dos casos estudados foi possível observar tecido mamário glandular não-neoplásico adjacente ao tecido tumoral. Com o anticorpo anti-Cox-2 SP21 foi possível observar um padrão de marcação da membrana citoplasmática (Figura 4), com mais de 75% das células a apresentarem marcação (grau 4) de forte intensidade (+++). De salientar que a imunomarcação foi observada maioritariamente no pólo apical da membrana.

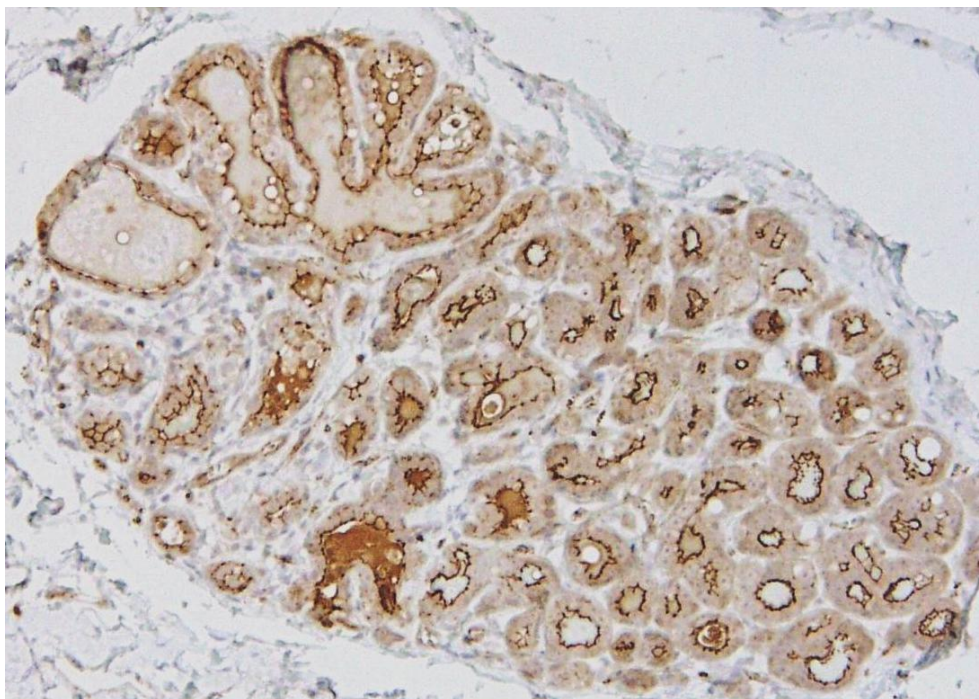


Figura 4 - Glândula mamária não-neoplásica.

Glândula mamária normal adjacente a tumor, evidenciando marcação da membrana citoplasmática para a Cox-2 em mais de 75% das células (grau 4) e com forte intensidade (+++) (Clone SP21, Hematoxilina de Mayer, 100x).

### 3.3.4 Marcação para Cox-2 nos tumores mamários

Os resultados obtidos para cada um dos anticorpos foram bastante distintos (Tabela 11). Com o Clone 33, ainda que tenha sido detetada a presença de células com marcação para a Cox-2 em todos os tumores, apenas um foi considerado positivo tendo em consideração o sistema de classificação adotado (Tabela 6), cujo limiar de positividade foi de 10% ou mais de células com marcação. Este tumor, um carcinoma tubular de grau III, apresentou marcação em 21% das células tumorais. O padrão de imunomarcação observado foi perinuclear e citoplasmático intenso (+++) (Figura 5A). É de salientar que o padrão observado nas células tumorais marcadas nos restantes casos foi também perinuclear e citoplasmático.

Ao contrário do que foi observado com o Clone 33, a maioria dos tumores foram considerados positivos para a Cox-2 após incubação com anticorpo Clone SP21 (20/21), sendo a exceção o carcinoma anaplásico (Figura 6). Na Figura 7, podemos observar o resultado da imunomarcação do mesmo tumor, um carcinoma tubular de grau I, com cada um dos anticorpos, ficando claro o contraste, em termos de marcação, entre ambos. A marcação com o Clone SP21 foi predominantemente membranar, apresentando os tumores mais diferenciados um padrão semelhante à glândula mamária não-neoplásica adjacente, ou seja, marcação predominantemente apical das células do epitélio luminal (Figura 8). Ainda assim, o padrão citoplasmático e perinuclear observado no carcinoma tubular de grau III anteriormente referido, assim como em algumas células nos restantes tumores, manteve-se com este anticorpo (Figura 5B). Ambos os padrões apresentaram intensidade de marcação forte (+++).

Tabela 11 – Níveis de expressão de Cox-2 nos tumores mamários para os dois anticorpos

Níveis de expressão de Cox-2		0	1	2	3	4
Número de Tumores	Clone 33	20 (95,2%)	1 (4,8%)	0	0	0
	Clone SP21	1 (4,8%)	1 (4,8%)	2 (9,5%)	5 (23,8%)	12 (57,1%)

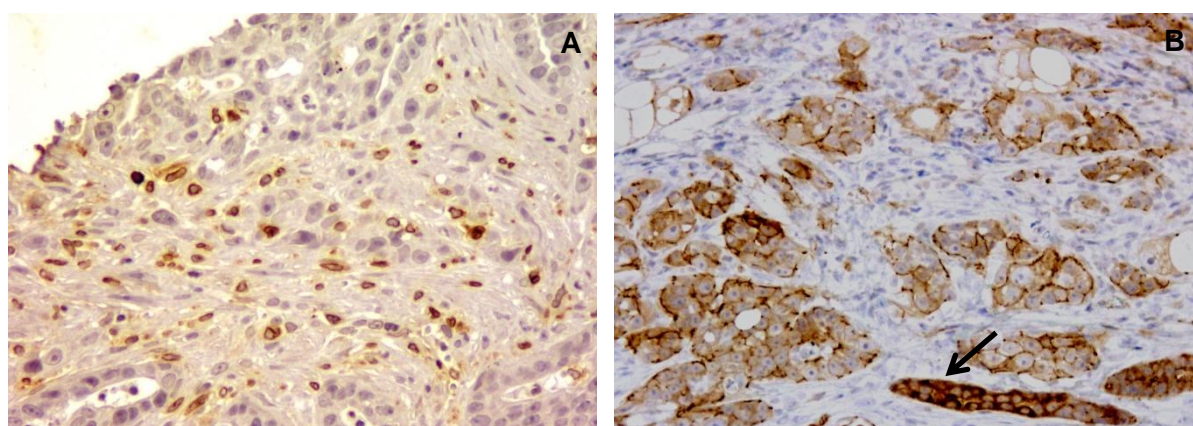


Figura 5 - Carcinoma tubular de grau III.

A - Marcação citoplasmática e perinuclear de 21% das células tumorais após incubação com o anticorpo anti-Cox-2 Clone 33 (Hematoxilina de Mayer, 200x); B - Marcação da membrana celular e citoplasmática/perinuclear (seta) de mais de 75% das células tumorais, após incubação com o anticorpo anti-Cox-2, Clone SP21 (Hematoxilina de Mayer, 200x).



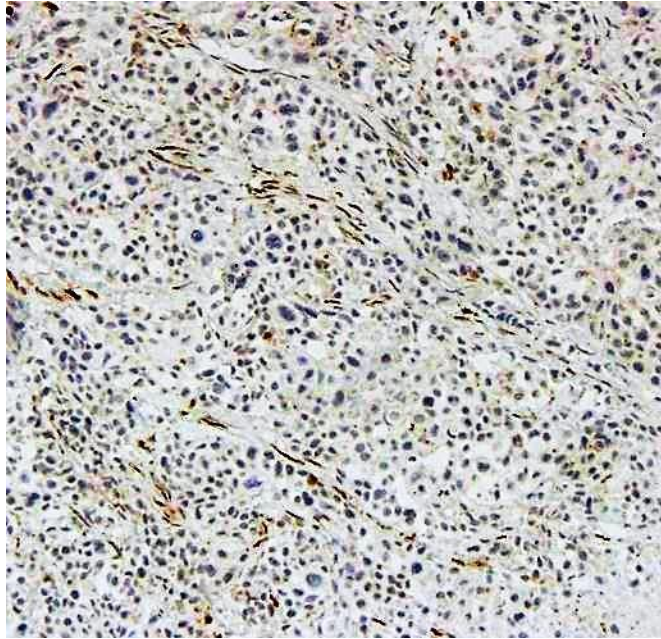


Figura 6 - Carcinoma anaplásico de grau III.

Marcação de menos de 10% das células tumorais com o anticorpo anti-Cox-2, Clone SP21 (Hematoxilina de Mayer, 100x).

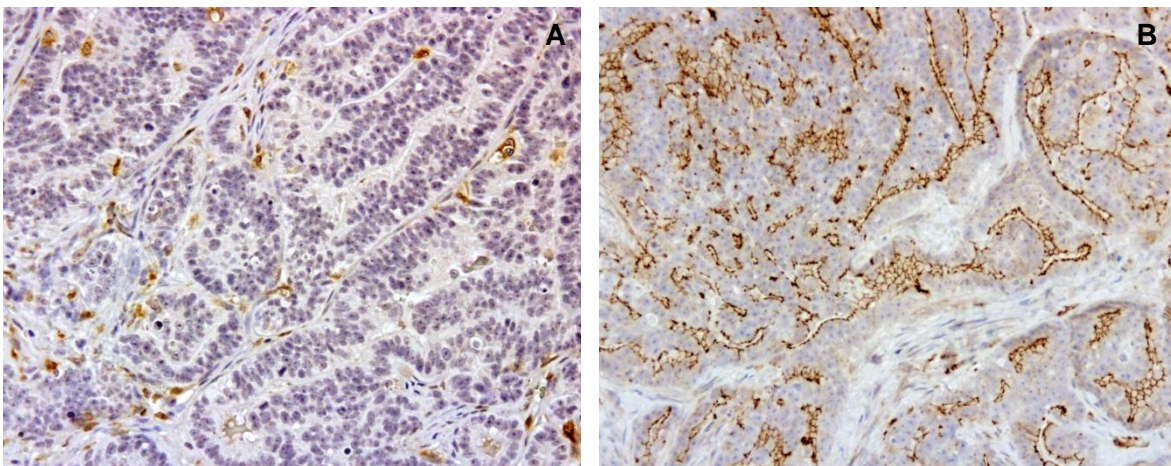


Figura 7 - Carcinoma tubular de grau I.

A - Ausência de marcação para Cox-2 nas células tumorais com o Clone 33 (Hematoxilina de Mayer, 200x); B - Marcação da membrana celular de mais de 75% das células tumorais com o Clone SP21 (Hematoxilina de Mayer, 200x).

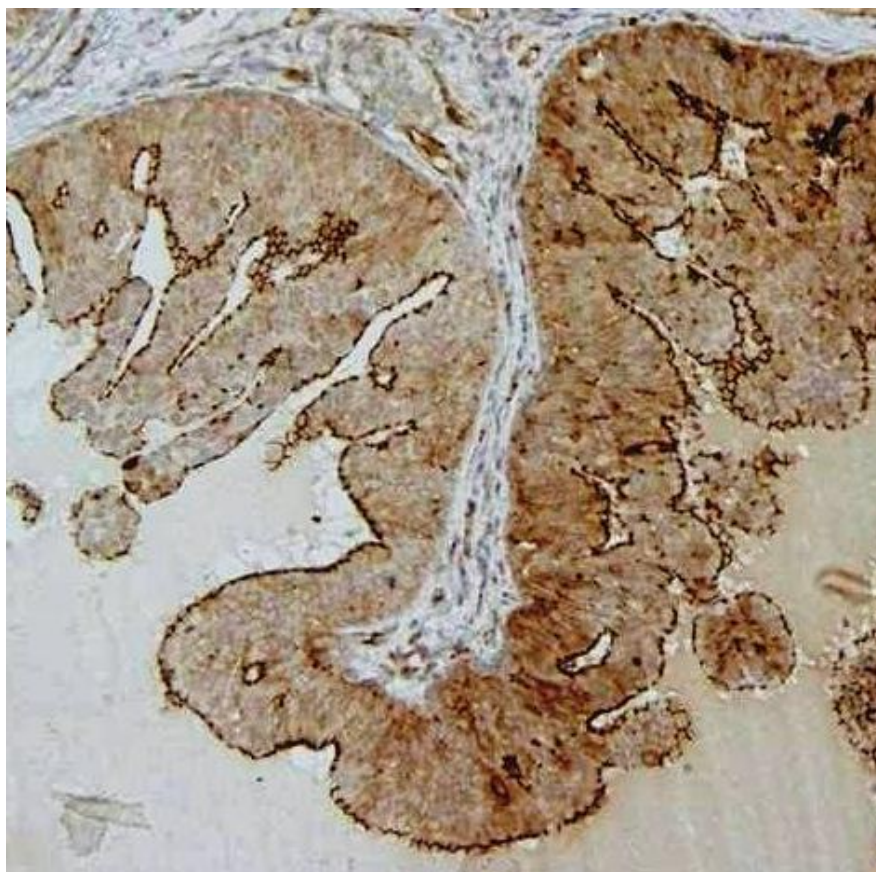


Figura 8 - Carcinoma tubulo-papilífero de grau I.

Marcação para Cox-2 predominantemente apical (Clone SP21, Hematoxilina de Mayer, 100x).

### 3.3.5 Marcação para Cox-2 nas células do estroma

Ambos os anticorpos mostraram afinidade para células fusiformes presentes no estroma das massas tumorais. A expressão de Cox-2 por estas células do estroma foi particularmente forte no tumor anaplásico que apresentou pouca marcação (<10%) das células neoplásicas, tanto com o Clone SP21 (Figura 6), como com o Clone 33 (Figura 9).



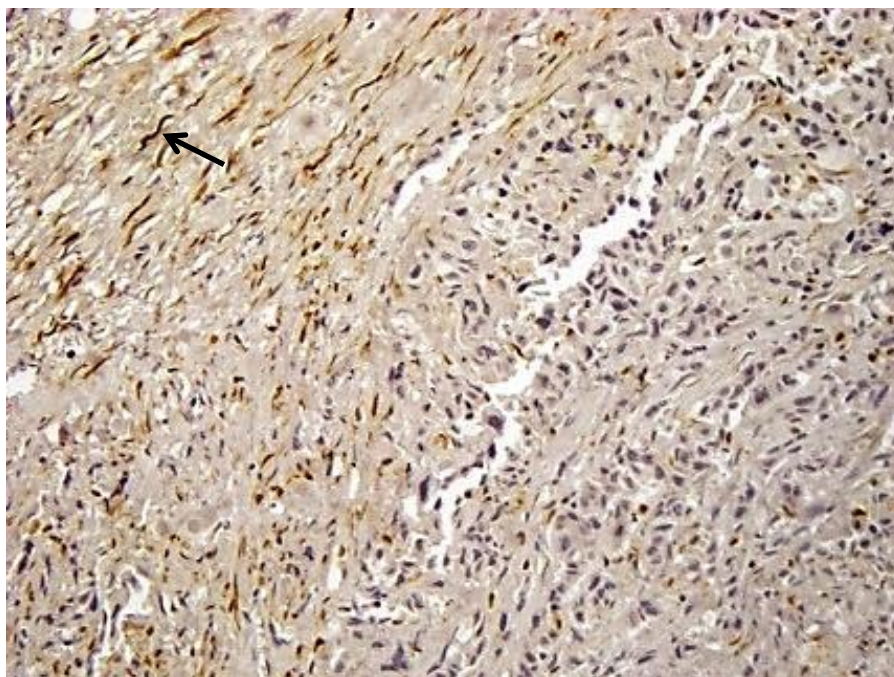


Figura 9 - Carcinoma anaplásico de grau III.

Marcação de células fusiformes do estroma (seta) com o Clone 33 (Hematoxilina de Mayer, 200x).

### 3.3.6 Outros parâmetros imunohistoquímicos

No que diz respeito aos recetores hormonais, a maioria dos casos foi negativa para os recetores de estrogénio 67% (14/21) e positiva para os recetores de progesterona 62% (13/21); grande parte dos tumores 52% (11/21) pôde ser classificada como RE<sup>-</sup>/RP<sup>+</sup> (resultados gentilmente cedidos por Dra. Maria João Soares).

Uma percentagem considerável dos tumores estudados apresentou sobreexpressão da proteína HER-2 (47,6%). Cerca de 40% destes apresentavam imunomarcação intensa (3+), enquanto os restantes 60% apresentavam moderada ou ligeira (2+ ou 1+) (resultados gentilmente cedidos por Dra. Maria João Soares).

A média das células que marcava para a proteína Ki-67 (utilizada para medir a taxa de proliferação tumoral) foi de  $14,9 \pm 7,9$  %, com um valor mínimo de 5% e máximo de 28% (resultados gentilmente cedidos por Dra. Maria João Soares).

Não foi identificada qualquer correlação estatisticamente significativa entre os níveis de expressão de Cox-2 como Clone SP21 e os parâmetros imunohistoquímicos acima referidos (Anexo 2).

### 3.4 Discussão

No presente estudo foi possível identificar marcação positiva para Cox-2 nos tumores mamários de gata, embora com padrões que mostram variações na sensibilidade dos anticorpos utilizados.

Relativamente à imunodeteção de Cox-2, foi possível observar dois padrões distintos, um citoplasmático/perinuclear e um membranar. A marcação membranar foi apenas observada quando o Clone SP21 foi utilizado, enquanto o padrão citoplasmático/perinuclear foi visualizado em ambos os anticorpos anti-Cox-2. A marcação membranar verificou-se tanto no tecido mamário não-neoplásico, como no tecido tumoral, tendo servido como controle positivo interno. Como já foi referido anteriormente, a marcação membranar predominantemente apical observada no tecido não-neoplásico foi bastante semelhante ao padrão apresentado pelos tumores mais diferenciados.

A Cox-2 é uma proteína de membrana que se localiza na superfície luminal do retículo endoplasmático e na membrana nuclear (Clària, 2003). No entanto, alguns autores sugerem que esta enzima também se pode localizar na membrana celular (Liou, Deng, Gilroy, Shyue & Wu, 2001; Perrone et al., 2007). Um estudo sobre a expressão de Cox-2 na glândula mamária da cadela com o anticorpo SP21 mostrou marcação da membrana celular, na glândula mamária normal, nos tumores malignos e nos tumores benignos (Pereira et al., 2009). Na gata, também foi descrito um padrão de marcação membranar na glândula mamária normal e no tecido tumoral com anticorpo SP21 (Sousa, 2010). Neste estudo foi ainda observada uma marcação citoplasmática em algumas células tumorais. Uma particularidade do estudo de Sousa (2010) foi que a maioria dos tumores apenas apresentava marcação para a Cox-2 nas células do epitélio luminal, o que foi observado em alguns dos tumores analisados por nós. Este autor afirma ainda que as neoplasias malignas analisadas apresentavam níveis de expressão de Cox-2 mais elevados, comparativamente às hiperplasias, não existindo diferença significativa entre o grupo das hiperplasias/displasias e o das neoplasias benignas. No estudo aqui apresentado não foi possível confirmar este resultado, visto que a nossa amostra era constituída exclusivamente por tumores malignos, apenas com algum tecido não neoplásico adjacente.

É no entanto de salientar que estudos feitos com outros anticorpos anti-Cox-2, tanto na gata (Millanta et al., 2006), como na mulher (Davies et al., 2003), não evidenciaram marcação na glândula mamária não-neoplásica, ao contrário do observado nas nossas amostras.

Relativamente ao anticorpo anti-Cox-2 Clone 33, não foi encontrada nenhuma literatura relativa à sua utilização em tecidos de gata. Este anticorpo foi incluído no nosso estudo por existir uma extensa homologia (96%) entre a Cox-2 canina e felina (Sayasith et al., 2009) e

porque trabalhos anteriores na cadela revelaram uma marcação citoplasmática e perinuclear específica (Queiroga et al., 2010; Queiroga et al., 2011), à semelhança do que observamos no presente estudo, com um caso positivo registado.

É importante sublinhar que o tumor anaplásico analisado mostrou marcação de Cox-2 em menos de 10% das células tumorais em ambos os anticorpos. Na cadela, este tipo histológico de tumor mamário apresenta forte sobreexpressão de Cox-2 (Heller et al., 2005). O facto de a nossa amostra apresentar um único tumor anaplásico, não permite concluir sobre a marcação prevalente nestas neoplasias.

No que diz respeito às características da amostragem, a média de idades dos animais com tumores mamários (12,75 anos) encontra-se de acordo com os resultados de Hayes & Mooney (1985) citados por Soremno (2011), que referem uma média de idades entre os 10 e os 12 anos.

Quanto à localização das lesões, 62% localizavam-se na região caudal, ou seja, nas glândulas mamárias abdominais posteriores e inguinais, o que também está de acordo com alguns estudos (Novosad et al., 2006; Borrego, Cartagena & Engel, 2009). Peleteiro (1994) refere que as lesões mamárias nas gatas raramente ultrapassam os 8 cm, o que está igualmente de acordo com o que foi observado neste estudo, onde a lesão de maiores dimensões possuía 6 cm.

Alguns dos animais apresentavam lesões múltiplas, o que vai ao encontro do referido por Misdorp (2002) e Misdorp et al. (1999), ainda que os autores afirmem que esta situação é mais comum na espécie canina.

No que toca ao elevado número registado de tumores mamários felinos negativos para os RE e positivos para os RP, está de acordo com o referido por outros estudos: Hamilton, Else & Forshaw (1976)<sup>6</sup> e Johnston, Hayden, Kiang, Handschin & Johnston (1984)<sup>7</sup>, citados por De las Mulas et al. (2002), De Las Mulas et al. (2000) e Millanta et al. (2005). O facto de grande parte dos tumores ser classificada como RE-/RP+ está também de acordo com o descrito por Millanta et al. (2005). No que diz respeito à proteína Ki-67, os tumores avaliados apresentaram um índice médio de Ki-67 (14,9%) inferior ao descrito em trabalhos anteriores. Millanta, Lazzeri, Mazzei, Vannozzi & Poli (2002), numa amostra de 48 casos, apresentam um valor mediano de 18,7%, apresentando 12 casos índices superiores a 22,7%. Sousa, (2010) e Rasotto et al. (2011) apresentaram índices médios de 37,7% e 29,8%, respetivamente.

Não foram realizados testes estatísticos para os resultados obtidos com o Clone 33, uma vez que com este clone obteve-se apenas um caso positivo.

Foi encontrada uma correlação estatisticamente significativa ( $p=0,021$ ) entre a classificação histológica e os níveis de expressão de Cox-2 com o o Clone SP21, sendo que todos os



carcinomas tubulares analisados (n=6) apresentaram imunomarcação em >75% das células tumorais. Na espécie canina existem estudos que associam a sobreexpressão de Cox-2 com certos tipos histológicos. (Heller et al., 2005; Queiroga et al., 2007). No caso dos felinos, Sousa (2010) relata uma correlação deste tipo, sendo que os carcinomas sólidos mostram maior intensidade de marcação. Millanta et al. (2006), pelo contrário, não encontrou correlação entre a sobreexpressão de Cox-2 e o tipo histológico, mas encontrou correlação entre a sobreexpressão de Cox-2, a falta de expressão dos RE e a expressão elevada dos RP. No nosso estudo não se verificou correlação entre a sobreexpressão de Cox-2 e as expressões dos recetores hormonais. É, contudo, importante ter em conta a pequena dimensão da amostra (n=21) do presente trabalho na interpretação do resultados. Estudos com amostras de maior dimensão serão necessários de modo a esclarecer a relação entre os níveis de expressão da Cox-2 e os diversos parâmetros clinicopatológicos e imunohistoquímicos referidos.

Existem alguns trabalhos em medicina humana que se debruçaram sobre a expressão de Cox-2 e a produção de PGE2 pelas células mamárias do estroma. Park et al. (2011) refere que as prostaglandinas produzidas pelas células do estroma induzem a sobreexpressão de Cox-2 que por sua vez influencia o metabolismo das células tumorais. Outro estudo (Hu et al., 2008) aponta os fibroblastos do estroma como os responsáveis pelo aumento da expressão da Cox-2 nas células tumorais. Por outro lado, alguns trabalhos referem que os fibroblastos influenciam o desenvolvimento tumoral através da secreção de PGE2 (Schrey & Patel, 1995; Rudnick et al., 2011) e que os próprios fibroblastos também são sensíveis à ação da PGE2 (Rudnick et al., 2011). É importante referir que Rudnick et al. (2011) demonstrou que os fibroblastos são metabolicamente heterogéneos. Assim, os resultados relativos à imunodeteção de Cox-2 nos fibroblastos do estroma dos carcinomas mamários felinos demonstram que, também nesta espécie, este tipo de células poderá desempenhar um papel muito relevante no crescimento tumoral, podendo constituir um alvo específico na terapia anti-tumoral.

### 3.5 Conclusão

Tendo em conta o mau prognóstico associado aos tumores mamários na gata é fundamental esclarecer o papel da Cox-2 como indicador de prognóstico e alvo terapêutico neste tipo de tumores.

No trabalho aqui apresentado podemos concluir que não só a sobreexpressão de Cox-2, mas também o padrão de marcação poderão ter importância na identificação de pacientes que possam vir a beneficiar do tratamento com inibidores da Cox-2. Outro parâmetro que nos parece ser relevante na identificação destes pacientes é a classificação histológica do tumor segundo os critérios da OMS, uma vez que os carcinomas tubulares e tubulo-papilíferos estão associados a níveis mais elevados de Cox-2. No entanto, será essencial confirmar esta correlação, assim como a relação entre a expressão da Cox-2 com outros parâmetros clinicopatológicos e imunohistoquímicos, e a importância do padrão de marcação em amostras de maior dimensão, usando diferentes anticorpos.

Atendendo à aparente importância do padrão de marcação, podemos concluir que dos dois anticorpos anti-Cox-2 testados, e tendo em consideração os protocolos adotados, o Clone 33 é o mais indicado para a deteção da Cox-2 em tumores felinos. Ainda assim, consideramos ser imprescindível continuar à otimização da técnica de deteção da Cox-2, com a utilização de uma amostragem de maiores dimensões, com a realização de variações no protocolo de IHQ, com estes e outros anticorpos, de forma a alcançar resultados fiáveis e reprodutíveis.

## Bibliografia

- Adderley, S.R. & Fitzgerald, D.J. (1999). Oxidative damage of cardiomyocytes is limited by extracellular regulated kinases 1/2-mediated induction of cyclooxygenase-2. *Journal of Biological Chemistry*, 274(8), 5038-5046.
- Almeida, E.M.P., Piché, C., Sirois, J. & Doré, M. (2001). Expression of cyclo-oxygenase-2 in naturally occurring squamous cell carcinomas in dogs. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 49(7), 867-875.
- Arber, N., Eagle, C.J., Spicak, J., Rácz, I., Dite, P., Hajer, J., Zavoral, M., Lechuga, M.J., Gerletti, P., Tang, J., Rosenstein, R.B., Macdonald, K., Bhadra, P., Fowler, R., Wittes, J., Zauber, A.G., Solomon, S.D., Levin, B. (2006). Celecoxib for the prevention of colorectal adenomatous polyps. *New England Journal of Medicine*, 355(9), 885-895.
- Argani, P., Cimino-Mathews, A. (2012). *Overview of Histologic Grade: Nottingham Histologic Score ("Elston Grade")*. Acedido em jan. 3, 2013. Disponível em: <http://pathology.jhu.edu/breast/grade.php>
- Ashok, V., Dash, C., Rohan, T.E., Sprafka, J.M. & Terry, P.D. (2011). Selective cyclooxygenase-2 (Cox-2) inhibitors and breast cancer risk. *Breast*, 20(1), 66-70.
- Backlund, M.G., Mann, J.R., Holla, V.R., Buchanan, F.G., Tai, H.H., Musiek, E.S., Milne, G.L., Katkuri, S. & DuBois, R.N. (2005). 15-Hydroxyprostaglandin dehydrogenase is down-regulated in colorectal cancer. *Journal of Biological Chemistry*, 280(5), 3217-3223.
- Balkwill, F. (2004). Cancer and the chemokine network. *Nature Reviews. Cancer*, 4(7), 540-550.
- Balkwill, F. & Mantovani, A. (2001). Inflammation and cancer: back to Virchow? *The Lancet*, 357(9255), 539-545.
- Barısık, N.O., Keser, S.H., Gul, A.E., Senu, S., Kandemir, N.O., Kucuk, H.F., Gumus, M. & Karadayı, N. The value of Cox-2 expression in the prognostic parameters of invasive ductal carcinoma of the breast. *Medical Oncology*, 28(3), 703-708.
- Bardagí, M., Fondevila, D. & Ferrer, L. (2012). Immunohistochemical detection of Cox-2 in feline and canine actinic keratoses and cutaneous squamous cell carcinoma. *Journal of Comparative Pathology*, 146(1), 11-17.
- Barone, R. (1996). *Anatomie comparée des mammifères domestique: Tome 5 - Angiologie*. (2e éd). Paris: Éditions Vigot.
- Beam, S.L., Rassnick, K.M., Moore, A.S. & McDonough, S.P. (2003). An immunohistochemical study of cyclooxygenase-2 expression in various feline neoplasms. *Veterinary Pathology*, 40(5), 496-500.
- Beazer-Barclay, Y., Levy, D.B., Moser, A.R., Dove, W.F., Hamilton, S.R., Vogelstein, B. & Kinzler, K.W. (1996). Sulindac suppresses tumorigenesis in the Min mouse. *Carcinogenesis*, 17(8), 1757-1760.

- Becerra, C.R., Frenkel, E.P., Ashfaq, R. & Gaynor, R.B. (2003). Increased toxicity and lack of efficacy of Rofecoxib in combination with chemotherapy for treatment of metastatic colorectal cancer: A phase II study. *International Journal of Cancer*, 105(6):868-872.
- Becker, M.R, Siegelin, M.D., Rompel, R., Enk, A.H. & Gaiser, T. (2009). Cox-2 expression in malignant melanoma: a novel prognostic marker? *Melanoma Research*, 19(1), 8-16.
- Bennett, A., Charlier, E.M., McDonald, A.M., Simpson, J.S., Stamford, I.F. & Zebro, T. (1977). Prostaglandins and breast cancer. *The Lancet*, 2(8039), 624-626.
- Bergman, P.J. (2006). Advances Mammary Gland Tumors. In Proceeding of the LAVC - Latin American Veterinary Conference, Lima, Peru, 5-8 outubro 2007.
- Bergman, P. J. (2007). Mammary gland tumors. In *Proceedings of the L. A. V. Conference (Ed.), The Latin American Veterinary Conference*, Lima, Perú, 2007. Lima, Perú: LAVT. Acedido em jan. 8, 2013. Disponível em: <http://www.ivis.org/proceedings/lavc/2007/bergman2.pdf>
- Bertagnolli, M.M., Eagle, C.J., Zauber, A.G., Redston, M., Solomon, S.D., Kim, K., Tang, J., Rosenstein, R.B., Wittes, J., Corle, D., Hess, T.M., Woloj, G.M., Boissarie, F., Anderson, W.F., Viner, J.L., Bagheri, D., Burn, J., Chung, D.C., Dewar, T., Foley, T.R., Hoffman, N., Macrae, F., Pruitt, R.E., Saltzman, J.R., Salzberg, B., Sylwestrowicz, T., Gordon, G.B., Hawk, E.T. Celecoxib for the prevention of sporadic colorectal adenomas. *New England Journal of Medicine*, 355(9), 873-884.
- Biramijamal, F., Allameh, A., Mirbod, P., Groene, H.J., Koomagi, R. & Hollstein, M. (2001). Unusual profile and high prevalence of p53 mutations in esophageal squamous cell carcinomas from northern Iran. *Cancer Research*, 61(7), 3119-3123.
- Boland, G.P., Butt, I.S., Prasad, R., Knox, W.F. & Bundred, N.J. (2004). Cox-2 expression is associated with an aggressive phenotype in ductal carcinoma in situ. *British Journal of Cancer*, 90(2), 423-429.
- Bombardier C, Laine L, Reicin A, Shapiro D, Burgos-Vargas R, Davis B, Day R, Ferraz MB, Hawkey, C.J., Hochberg, M.C., Kvien, T.K. & Schnitzer, T.J. (2000). Comparison of upper gastrointestinal toxicity of rofecoxib and naproxen in patients with rheumatoid arthritis. VIGOR Study Group. *New England Journal of Medicine*, 343(21), 1520-1528.
- Bonnier, P., Charpin, C., Lejeune, C., Romain, S., Tubiana, N., Beedassy, B., Martin, P.M., Serment, H. & Piana, L. (1995). Inflammatory carcinomas of the breast: a clinical, pathological, or a clinical and pathological definition? *International Journal of Cancer*, 62(4), 382-385.
- Boria, P.A., Murry, D.J., Bennett, P.F., Glickman, N.W., Snyder, P.W., Merkel, B.L., Schlittler, D.L., Mutsaers, A.J., Thomas, R.M. & Knapp, D.W. (2004). Evaluation of cisplatin combined with piroxicam for the treatment of oral malignant melanoma and oral squamous cell carcinoma in dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 224(3), 388-394.
- Burger, J.A. & Kipps, T.J. (2006). CXCR4: a key receptor in the crosstalk between tumor cells and their microenvironment. *Blood*, 107(5), 1761-1767.

- Borrego, J.F., Cartagena, J.C. & Engel, J. (2009). Treatment of feline mammary tumours using chemotherapy, surgery and a Cox-2 inhibitor drug (meloxicam): a retrospective study of 23 cases (2002-2007). *Veterinary and Comparative Oncology*, 7(4), 213-221.
- Borzacchiello, G., Paciello, O. & Papparella, S. (2004). Expression of cyclooxygenase-1 and -2 in canine nasal carcinomas. *Journal of Comparative Pathology*, 131(1), 70-76.
- Borzacchiello, G., Russo, V. & Russo, M. (2007). Immunohistochemical expression of cyclooxygenase-2 in canine ovarian carcinomas. *Journal of Veterinary Medicine Series A*, 54(5), 247-249.
- Bresalier, R.S., Sandler, R.S., Quan, H., Bolognese, J.A., Oxenius, B., Horgan, K., Lines, C., Riddell, R., Morton, D., Lanas, A., Konstam, M.A., Baron, J.A. (2005). Cardiovascular events associated with rofecoxib in a colorectal adenoma chemoprevention trial. *New England Journal of Medicine*, 352(11), 1092-1102.
- Brito, S.A.P. (2011). *Produção de prostaglandinas pelo endométrio canino ao longo do ciclo éstrico e a sua relação com a transcrição de genes dos toll-like receptors*. Dissertação de Mestrado. Universidade Técnica de Lisboa, Faculdade de Medicina Veterinária, Lisboa.
- Buchanan, F.G., Wang, D., Bargiacchi, F. & DuBois, R.N. (2003). Prostaglandin E2 regulates cell migration via the intracellular activation of the epidermal growth factor receptor. *Journal of Biological Chemistry*, 278(37), 35451-35457.
- Buchanan, F.G., Gorden, D.L., Matta, P., Shi, Q., Matrisian, L.M. & DuBois, R.N. (2006). Role of beta-arrestin 1 in the metastatic progression of colorectal cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(5), 1492-1497.
- Buckman, S.Y., Gresham, A., Hale, P., Hruza, G., Anast, J., Masferrer, J. & Pentland, A.P. (1998). Cox-2 expression is induced by UVB exposure in human skin: implications for the development of skin cancer. *Carcinogenesis*, 19(5), 723-729.
- Bukholm, I.R., Bukholm, G. & Nesland, J.M. (2001). Over-expression of cyclin A is highly associated with early relapse and reduced survival in patients with primary breast carcinomas. *International Journal of Cancer*, 93(2), 283-287.
- Burkitt, H.G., Young, B. & Heath, J.W. (1994). Sistema Reprodutor Feminino. In Burkitt, H. George, *Wheater histologia funcional*. (3ª ed). (pp. 362-365). Rio de Janeiro, Brasil: Guanabara Koogan.
- Carlsson, J., Nordgren, H., Sjöström, J., Wester, K., Villman, K., Bengtsson, N.O., Ostenstad, B., Lundqvist, H., Blomqvist, C. (2004). HER2 expression in breast cancer primary tumours and corresponding metastases. Original data and literature review. *British Journal of Cancer*, 90(12), 2344-2348.
- Castelao, J.E., Yuan, J.M., Gago-Dominguez, M., Yu, M.C. & Ross, R.K. (2000). Non-steroidal anti-inflammatory drugs and bladder cancer prevention. *British Journal of Cancer*, 82(7), 1364-1369.

- Cesarman, E., Inghirami, G., Chadburn, A. & Knowles, D.M. (1993). High levels of p53 protein expression do not correlate with p53 gene mutations in anaplastic large cell lymphoma. *American Journal of Pathology*, 143(3), 845-856.
- Cetin, M., Buyukberber, S., Demir, M., Sari, I., Sari, I., Deniz, K., Eser, B., Altuntas, F., Camci, C., Oztürk, A., Turgut, B., Vural, O. & Unal, A. (2005). Overexpression of cyclooxygenase-2 in multiple myeloma: association with reduced survival. *America Journal of Hematology*, 80(3), 169-173.
- Cha, Y.I. & DuBois, R.N. (2007). NSAIDs and cancer prevention: targets downstream of Cox-2. *Annual Review of Medicine*, 58, 239-252.
- Chan, G., Boyle, J.O., Yang, E.K., Zhang, F., Sacks, P.G., Shah, J.P., Edelstein, D., Soslow, R.A., Koki, A.T., Woerner, B.M., Masferrer, J.L. & Dannenberg, A.J. (1999). Cyclooxygenase-2 expression is up-regulated in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer Research*, 59(5), 991-994.
- Chandrasekharan, N.V., Dai, H., Roos, K.L., Evanson, N.K., Tomsik, J., Elton, T.S. & Simmons, D.L. (2002). Cox-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure, and expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(21), 13926-13931.
- Chang, S.H., Liu, C.H., Conway, R., Han, D.K., Nithipatikom, K., Trifan, O.C., Lane, T.F. & Hla, T. (2004). Role of prostaglandin E2-dependent angiogenic switch in cyclooxygenase 2-induced breast cancer progression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(2), 591-596.
- Chen, E.P. & Smyth, E.M. (2011). Cox-2 and PGE2-dependent immunomodulation in breast cancer. *Prostaglandins Other Lipid Mediators*, 96(1-4), 14-20.
- Cheng, Y., Wang, M., Yu, Y., Lawson, J., Funk, C.D. & Fitzgerald, G.A. (2006). Cyclooxygenases, microsomal prostaglandin E synthase-1, and cardiovascular function. *Journal of Clinical Investigation*, 116(5), 1391-1399.
- Chulada, P.C., Thompson, M.B., Mahler, J.F., Doyle, C.M., Gaul, B.W., Lee, C., Tiano, H.F., Morham, S.G., Smithies, O. & Langenbach, R. (2000). Genetic disruption of Ptgs-1, as well as Ptgs-2, reduces intestinal tumorigenesis in Min mice. *Cancer Research*, 60(17), 4705-4708.
- Çiriş, I.M., Bozkurt, K.K., Başpınar, S. & Kapucuoğlu, F.N. (2011). Immunohistochemical Cox-2 overexpression correlates with HER-2/neu overexpression in invasive breast carcinomas: a pilot study. *Pathology - Research and Practice*, 207(3), 182-187.
- Clària, J. (2003). Cyclooxygenase-2 biology. *Current Pharmaceutical Design*, 9(27), 2177-2190.
- Cobleigh, M.A., Vogel, C.L., Tripathy, D., Robert, N.J., Scholl, S., Fehrenbacher, L., Wolter, J.M., Paton, V., Shak, S., Lieberman, G. & Slamon, D.J. (1999). Multinational study of the efficacy and safety of humanized anti-HER2 monoclonal antibody in women who have HER2-overexpressing metastatic breast cancer that has progressed after chemotherapy for metastatic disease. *Journal of Clinical Oncology*, 17(9), 2639-2648.

- Cook, N.R., Lee, I.M., Gaziano, J.M., Gordon, D., Ridker, P.M., Manson, J.E., Hennekens, C.H. & Buring, J.E. (2005). Low-dose aspirin in the primary prevention of cancer: the Women's Health Study: a randomized controlled trial. *JAMA: The Journal of the American Medical Association*, 294(1), 47-55.
- Costa, R.M.G., Santos, M., Amorim, I., Lopes, C., Pereira, P.D. & Faustino, A.M. (2009). An immunohistochemical study of feline endometrial adenocarcinoma. *Journal of Comparative Pathology*, 140(4), 254-259.
- Cuzick, J., Otto, F., Baron, J.A., Brown, P.H., Burn, J., Greenwald, P., Jankowski, J., La Vecchia, C., Meyskens, F., Senn, H.J. & Thun, M. (2009). Aspirin and non-steroidal anti-inflammatory drugs for cancer prevention: an international consensus statement. *The Lancet Oncology*, 10(5), 501-507.
- Daikoku, T., Wang, D., Tranguch, S., Morrow, J.D., Orsulic, S., DuBois, R.N. & Dey, S.K. (2005). Cyclooxygenase-1 is a potential target for prevention and treatment of ovarian epithelial cancer. *Cancer Research*, 65(9), 3735-3744.
- Daniel, T.O., Liu, H., Morrow, J.D., Crews, B.C. & Marnett, L.J. (1999). Thromboxane A2 is a mediator of cyclooxygenase-2-dependent endothelial migration and angiogenesis. *Cancer Research*, 59(18), 4574-4577.
- Davies, G., Salter, J., Hills, M., Martin, L.A., Sacks, N. & Dowsett, M. (2003). Correlation between cyclooxygenase-2 expression and angiogenesis in human breast cancer. *Clinical Cancer Research*, 9(7), 2651-2656.
- Davis, T.W., O'Neal, J.M., Pagel, M.D., Zweifel, B.S., Mehta, P.P., Heuvelman, D.M. & Masferrer, J.L. (2004). Synergy between celecoxib and radiotherapy results from inhibition of cyclooxygenase-2-derived prostaglandin E2, a survival factor for tumor and associated vasculature. *Cancer Research*, 64(1), 279-285.
- Denkert, C., Winzer, K.J., Müller, B.M., Weichert, W., Pest, S., Köbel, M., Kristiansen, G., Reles, A., Siegert, A., Guski, H. & Hauptmann, S. (2003). Elevated expression of cyclooxygenase-2 is a negative prognostic factor for disease free survival and overall survival in patients with breast carcinoma. *Cancer*, 97(12), 2978-2987.
- De las Mulas, J.M., Ordás, J., Millán, Y., Fernández-Soria, V. & Cajal, S.R. (2003). Oncogene HER-2 in canine mammary gland carcinomas: an immunohistochemical and chromogenic in situ hybridization study. *Breast Cancer Research and Treatment*, 80(3), 363-367.
- De las Mulas, J.M., van Niel, M., Millán, Y., Blankenstein, M.A., van Mil, F. & Misdorp, W. (2000). Immunohistochemical analysis of estrogen receptors in feline mammary gland benign and malignant lesions: comparison with biochemical assay. *Domestic Animal Endocrinology*, 18(1), 111-125.
- De las Mulas, J.M., van Niel, M., Millán, Y., Ordás, J., Blankenstein, M.A., Van Mil, F. & Misdorp, W. (2002). Progesterone receptors in normal, dysplastic and tumorous feline mammary glands. Comparison with oestrogen receptors status. *Research in Veterinary Science*, 72(2), 153-161.

- De Maria, R., Olivero, M., Iussich, S., Nakaichi, M., Murata, T., Biolatti, B. & Di Renzo, M.F. (2005). Spontaneous feline mammary carcinoma is a model of HER2 overexpressing poor prognosis human breast cancer. *Cancer Research*, 65(3), 907-912.
- DeWitt, D.L. & Smith, W.L. (1988). Primary structure of prostaglandin G/H synthase from sheep vesicular gland determined from the complementary DNA sequence. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 85(5), 1412-146.
- DiBernardi, L., Doré, M., Davis, J.A., Owens, J.G., Mohammed, S.I., Guptill, C.F. & Knapp, D.W. (2007). Study of feline oral squamous cell carcinoma: potential target for cyclooxygenase inhibitor treatment. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 76(4), 245-250.
- Ding, Y., Tong, M., Liu, S., Moscow, J.A. & Tai, H.H. (2005). NAD<sup>+</sup>-linked 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase (15-PGDH) behaves as a tumor suppressor in lung cancer. *Carcinogenesis*, 26(1), 65-72.
- Divvela, A.K.C., Challa, S.R. & Tagaram, I.K. (2010). Pathogenic Role of Cyclooxygenase-2 in Cancer. *Journal of Health Science*, 56(5), 502-516.
- Doré M. (2011). Cyclooxygenase-2 Expression in Animal Cancers. *Veterinary Pathology*, 48(1), 254-265.
- Doré, M., Lanthier, I. & Sirois, J. (2003). Cyclooxygenase-2 expression in canine mammary tumors. *Veterinary Pathology*, 40(2), 207-212.
- Dormond, O., Foletti, A., Paroz, C. & Rüegg, C. (2001). NSAIDs inhibit alpha V beta 3 integrin-mediated and Cdc42/Rac-dependent endothelial-cell spreading, migration and angiogenesis. *Nature Medicine*, 7(9), 1041-1047.
- Dubois, R.N., Abramson, S.B., Crofford, L., Gupta, R.A., Simon, L.S., Van De Putte, L.B. & Lipsky, P.E. (1998). Cyclooxygenase in biology and disease. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 12(12), 1063-1073.
- Dunnwald L.K., Rossing M.A. & Li, C.I. (2007). Hormone receptor status, tumor characteristics, and prognosis: a prospective cohort of breast cancer patients. *Breast Cancer Research*, 9(1), R6.
- Dutra, A.P., Granja, N.V., Schmitt, F.C. & Cassali, G.D. (2004). c-erbB-2 expression and nuclear pleomorphism in canine mammary tumors. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 37(11), 1673-1681.
- Eberhart, C.E. & Dubois, R.N. (1995). Eicosanoids and the gastrointestinal tract. *Gastroenterology*, 109(1), 285-301.
- Eccles, S.A. (2001). The role of c-erbB-2/HER2/neu in breast cancer progression and metastasis. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 6(4), 393-406.
- Elce, Y.A., Orsini, J.A. & Blikslager, A.T. (2007). Expression of cyclooxygenase-1 and -2 in naturally occurring squamous cell carcinomas in horses. *American Journal of Veterinary Research*, 68(1), 76-80.



- Eisenhardt, A., Frey, U., Tack, M., Roskopf, D., Lümmer, G., Rübber, H. & Siffert, W. (2005). Expression analysis and potential functional role of the CXCR4 chemokine receptor in bladder cancer. *European Urology*, 47(1), 111-117.
- European Medicines Agency (2010). *Questions and answers on the potential off-label use of celecoxib in patients with familial adenomatous polyposis*. Londres: EMA. Acedido em jan. 3, 2013. Disponível em: [http://www.emea.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/Medicine\\_QA/2011/05/WC500106538.pdf](http://www.emea.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Medicine_QA/2011/05/WC500106538.pdf)
- Farrow, D.C., Vaughan, T.L., Hansten, P.D., Stanford, J.L., Risch, H.A., Gammon, M.D., Chow, W.H., Dubrow, R., Ahsan, H., Mayne, S.T., Schoenberg, J.B., West, A.B., Rotterdam, H., Fraumeni, J.F. Jr & Blot, W.J. (1998). Use of aspirin and other nonsteroidal anti-inflammatory drugs and risk of esophageal and gastric cancer. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*, 7(2), 97-102.
- Ferrari, A., Petterino, C., Ratto, A., Campanella, C., Wurth, R., Thellung, S., Vito, G., Barbieri, F. & Florio, T. (2012). CXCR4 expression in feline mammary carcinoma cells: evidence of a proliferative role for the SDF-1/CXCR4 axis. *BMC Veterinary Research*, 8, 27.
- Fetsch, P.A. & Abati, A. (2007). The effects of antibody clone and pretreatment method on the results of HER2 immunostaining in cytologic samples of metastatic breast cancer: A query and a review of the literature. *Diagnostic Cytopathology*, 35(6), 319-328.
- Fitzgerald, G.A. (2004). Coxibs and cardiovascular disease. *New England Journal of Medicine*, 351(17), 1709-1711.
- Food and Drug Administration (2012, junho 8). Pfizer, Inc; Withdrawal of Approval of Familial Adenomatous Polyposis Indication for CELEBREX. *Federal Register*, 77(111).
- Flossmann, E., Rothwell, P.M. (2007). Effect of aspirin on long-term risk of colorectal cancer: consistent evidence from randomised and observational studies. *The Lancet*, 369(9573), 1603-1613.
- Fosslien, E. (2000). Molecular pathology of cyclooxygenase-2 in neoplasia. *Annals of Clinical & Laboratory Science*, 30(1), 3-21.
- Furian, M., Sandei, C.F.C.S., Rocha, E.J.N. & Lot, R.F.E. (2007). Estudos retrospectivo dos tumores mamários em caninos e felinos atendidos no Hospital Veterinário da FAMED entre 2003 a 2007. *Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária*, 8. Acedido em jan. 9, 2013. Disponível em: [www.revista.inf.br/veterinaria08/artigos/04.pdf](http://www.revista.inf.br/veterinaria08/artigos/04.pdf).
- Fux, R., Schwab, M., Thon, K.P., Gleiter, C.H. & Fritz, P. (2005). Cyclooxygenase-2 expression in human colorectal cancer is unrelated to overall patient survival. *Clinical Cancer Research*, 11(13), 4754-4760.

- Gallo, O., Masini, E., Bianchi, B., Bruschini, L., Paglierani, M. & Franchi, A. (2002). Prognostic significance of cyclooxygenase-2 pathway and angiogenesis in head and neck squamous cell carcinoma. *Human Pathology*, 33(7), 708-714.
- García-Rodríguez, L.A. & Huerta-Alvarez, C. (2001). Reduced risk of colorectal cancer among long-term users of aspirin and nonaspirin nonsteroidal antiinflammatory drugs. *Epidemiology*, 12(1), 88-93.
- Gasparini, G. (2000). Prognostic value of vascular endothelial growth factor in breast cancer. *The Oncologist*, 1, 37-44.
- Gee, J.R., Montoya, R.G., Khaled, H.M., Sabichi, A.L. & Grossman, H.B. (2003). Cytokeratin 20, AN43, PGDH, and Cox-2 expression in transitional and squamous cell carcinoma of the bladder. *Urologic Oncology*, 21(4), 266-270.
- Giardiello, F.M., Offerhaus, J.A., Tersmette, A.C., Hylind, L.M., Krush, A.J., Brensinger, J.D., Booker, S.V. & Hamilton, S.R. (1996). Sulindac induced regression of colorectal adenomas in familial adenomatous polyposis: evaluation of predictive factors. *Gut - International Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 38(4), 578-581.
- Giovannucci, E., Egan, K.M., Hunter, D.J., Stampfer, M.J., Colditz, G.A., Willett, W.C. & Speizer, F.E. (1995). Aspirin and the risk of colorectal cancer in women. *New England Journal of Medicine*, 333(10), 609-614.
- Giraudel, J.M., Gruet, P., Alexander, D.G., Seewald, W. & King, J.N. (2010). Evaluation of orally administered robenacoxib versus ketoprofen for treatment of acute pain and inflammation associated with musculoskeletal disorders in cats. *American Journal of Veterinary Research*, 71(7), 710-719.
- Goldschmidt, M., Peña, L., Rasotto, R. & Zappulli, V. (2011). Classification and grading of canine mammary tumors. *Veterinary Pathology*, 48(1), 117-131.
- Gupta, S., Srivastava, M., Ahmad, N., Bostwick, D.G. & Mukhtar, H. (2000). Over-expression of cyclooxygenase-2 in human prostate adenocarcinoma. *The Prostate*, 42(1): 73-78.
- Gupta, R.A., Tan, J., Krause, W.F., Geraci, M.W., Willson, T.M., Dey, S.K. & DuBois, R.N. (2000). Prostacyclin-mediated activation of peroxisome proliferator-activated receptor delta in colorectal cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(24), 13275-13280.
- Gupta, R.A., Tejada, L.V., Tong, B.J., Das, S.K., Morrow, J.D., Dey, S.K. & DuBois, R.N. (2003). Cyclooxygenase-1 is overexpressed and promotes angiogenic growth factor production in ovarian cancer. *Cancer Research*, 63(5), 906-911.
- Gustafsson, A., Hansson, E., Kressner, U., Nordgren, S., Andersson, M., Wang, W., Lönnroth, C. & Lundholm, K. (2007). EP1-4 subtype, Cox and PPAR gamma receptor expression in colorectal cancer in prediction of disease-specific mortality. *International Journal of Cancer*, 121(2), 232-240.

- Half, E., Tang, X.M., Gwyn, K., Sahin, A., Wathen, K. & Sinicrope, F.A. (2002). Cyclooxygenase-2 expression in human breast cancers and adjacent ductal carcinoma in situ. *Cancer Research*, 62(6), 1676-1681.
- Harris, R.E., Beebe-Donk, J. & Alshafie, G.A. (2006). Reduction in the risk of human breast cancer by selective cyclooxygenase-2 (Cox-2) inhibitors. *BMC Cancer*, 6, 27.
- Harris, S.G., Padilla, J., Koumas, L., Ray, D. & Phipps, R.P. (2002). Prostaglandins as modulators of immunity. *Trends in Immunology*, 23(3), 144-150.
- Hayden, D.W., Johnston, S.D., Kiang, D.T., Johnson, K.H. & Barnes, D.M. (1981). Feline mammary hypertrophy/fibroadenoma complex: clinical and hormonal aspects. *American Journal of Veterinary Research*, 42(10), 1699–1703.
- Hayes, A. (2007). Cancer, cyclo-oxygenase and nonsteroidal anti-inflammatory drugs - can we combine all three? *Veterinary and Comparative Oncology*, 5(1), 1-13.
- Hayes, A., Scase, T., Miller, J., Murphy, S., Sparkes, A. & Adams, V. (2006). Cox-1 and Cox-2 expression in feline oral squamous cell carcinoma. *Journal of Comparative Pathology*, 135(2-3), 93-99.
- Heller, D.A., Clifford, C.A., Goldschmidt, M.H., Holt, D.E., Shofer, F.S., Smith, A. & Sorenmo, K.U. (2005). Cyclooxygenase-2 expression is associated with histologic tumor type in canine mammary carcinoma. *Veterinary Pathology*, 42(6), 776-780.
- Henry CJ, McCaw DL, Turnquist SE, Tyler JW, Bravo L, Sheafor S, Straw RC, Dernell WS, Madewell, B.R., Jorgensen, L., Scott, M.A., Higginbotham, M.L. & Chun, R. (2003). Clinical evaluation of mitoxantrone and piroxicam in a canine model of human invasive urinary bladder carcinoma. *Clinical Cancer Research*, 9(2), 906-911.
- Hernández, G.L., Volpert, O.V., Iñiguez, M.A., Lorenzo, E., Martínez-Martínez, S., Grau, R., Fresno, M. & Redondo, J.M. (2001). Selective inhibition of vascular endothelial growth factor-mediated angiogenesis by cyclosporin A: roles of the nuclear factor of activated T cells and cyclooxygenase 2. *The Journal of Experimental Medicine*, 193(5), 607-620.
- Holla, V.R., Wang, D., Brown, J.R., Mann, J.R., Katkuri, S. & DuBois, R.N. (2005). Prostaglandin E2 regulates the complement inhibitor CD55/decay-accelerating factor in colorectal cancer. *Journal of Biological Chemistry*, 280(1), 476-483.
- Holmes, M.D., Chen, W.Y., Li, L., Hertzmark, E., Spiegelman, D. & Hankinson, S.E. (2010). Aspirin intake and survival after breast cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 28(9), 1467-1472.
- Howe, L.R. & Dannenberg, A.J. (2003). Cox-2 inhibitors for the prevention of breast cancer *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 8(1), 31-43.
- Hsu, W.L., Lin, H.Y., Chiou, S.S., Chang, C.C., Wang, S.P., Lin, K.H., Chulakasian, S., Wong, M.L. & Chang, S.C. (2010). Mouse mammary tumor virus-like nucleotide sequences in canine and feline mammary tumors. *Journal of Clinical Microbiology*, 48(12), 4354-4362.

- Hu, M., Peluffo, G., Chen, H., Gelman, R., Schnitt, S. & Polyak, K. (2009). Role of COX-2 in epithelial-stromal cell interactions and progression of ductal carcinoma in situ of the breast. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(9), 3372-3377.
- Hughes, K. & Dobson, J.M. (2012). Prognostic histopathological and molecular markers in feline mammary neoplasia. *Veterinary Journal*, 194(1), 19-26.
- Hwang, D., Scollard, D., Byrne, J. & Levine, E. (1998). Expression of cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 in human breast cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, 90, 455-460.
- Iñiguez, M.A., Rodríguez, A., Volpert, O.V., Fresno, M. & Redondo, J.M. (2003). Cyclooxygenase-2: a therapeutic target in angiogenesis. *Trends in Molecular Medicine*, 9(2), 73-78.
- Jiménez, P., Piazuolo, E., Cebrian, C., Ortego, J., Strunk, M., García-Gonzalez, M.A., Santander, S., Alcedo, J. & Lanas, A. (2010). Prostaglandin EP2 receptor expression is increased in Barrett's oesophagus and oesophageal adenocarcinoma. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 31(3), 440-451.
- Jing, H., Vassiliou, E. & Ganea, D. (2003). Prostaglandin E2 inhibits production of the inflammatory chemokines CCL3 and CCL4 in dendritic cells. *Journal of Leukocyte Biology*, 74(5), 868-879.
- Jing, H., Yen, J.H. & Ganea, D. (2004). A novel signaling pathway mediates the inhibition of CCL3/4 expression by prostaglandin E2. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(53), 55176-55186.
- Jones, C.J. & Budberg, S.C. (2000). Physiologic characteristics and clinical importance of the cyclooxygenase isoforms in dogs and cats. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 217(5), 721-729.
- Jottini, S., Canton, A.M., Muzzoni, E., Reppas, G. & Corradi, A.J. (2009). Immunohistochemical Expression of Cyclooxygenase-2 (Cox-2) in Four Cases of Equine Mammary Gland Tumours. *Journal of Comparative Pathology*, 141(4), 291-291.
- Junqueira, L.C. & Carneiro, J. (2004). Aparelho reprodutor feminino. In L.C. Junqueira, J. Carneiro (Eds.), *Histologia básica* (10th ed.). (pp.449-452). Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.
- Kalinski, P. (2012). Regulation of immune responses by prostaglandin E2. *Journal of Immunology*, 188(1), 21-28.
- Kamata, M., King, J.N., Seewald, W., Sakakibara, N., Yamashita, K. & Nishimura, R. (2012). Comparison of injectable robenacoxib versus meloxicam for peri-operative use in cats: results of a randomised clinical trial. *The Veterinary Journal*, 193(1), 114-118.
- Kamei, D., Murakami, M., Nakatani, Y., Ishikawa, Y., Ishii, T. & Kudo, I. (2003). Potential role of microsomal prostaglandin E synthase-1 in tumorigenesis. *Journal of Biological Chemistry*, 278(21), 19396-19405.

- Kargman, S.L., O'Neill, G.P., Vickers, P.J., Evans, J.F., Mancini, J.A. & Jothy, S. (1995). Expression of prostaglandin G/H synthase-1 and -2 protein in human colon cancer. *Cancer Research*, 55(12), 2556-2559.
- Kashfi, K. & Rigas, B. (2005). Non-Cox-2 targets and cancer: expanding the molecular target repertoire of chemoprevention. *Biochemical Pharmacology*, 70(7), 969-986.
- Kawamori, T., Rao, C.V., Seibert, K. & Reddy, B.S. (1998). Chemopreventive activity of celecoxib, a specific cyclooxygenase-2 inhibitor, against colon carcinogenesis. *Cancer Research*, 58(3), 409-412.
- Kawamori, T., Uchiya, N., Nakatsugi, S., Watanabe, K., Ohuchida, S., Yamamoto, H., Maruyama, T., Kondo, K., Sugimura, T., Wakabayashi, K. (2001). Chemopreventive effects of ONO-8711, a selective prostaglandin E receptor EP(1) antagonist, on breast cancer development. *Carcinogenesis*, 22(12), 2001-2004.
- Kelloff, G.J., Fay, J.R., Steele, V.E., Lubet, R.A., Boone, C.W., Crowell, J.A. & Sigman, C.C. (1996). Epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors as potential cancer chemopreventives. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention: a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*, 5(8), 657-666.
- Khan, K.N., Knapp, D.W., Denicola, D.B. & Harris, R.K. (2000). Expression of cyclooxygenase-2 in transitional cell carcinoma of the urinary bladder in dogs. *American Journal of Veterinary Research*, 61(5), 478-481.
- Khan, K.N., Stanfield, K.M., Trajkovic, D. & Knapp, D.W. (2001). Expression of cyclooxygenase-2 in canine renal cell carcinoma. *Veterinary Pathology*, 38(1), 116-119.
- Khor, L.Y., Bae, K., Pollack, A., Hammond, M.E., Grignon, D.J., Venkatesan, V.M., Rosenthal, S.A., Ritter, M.A., Sandler, H.M., Hanks, G.E., Shipley, W.U. & Dicker, A.P. (2007). Cox-2 expression predicts prostate-cancer outcome: analysis of data from the RTOG 92-02 trial. *The Lancet Oncology*, 8(10), 912-920.
- King, J.N., Hotz, R., Reagan, E.L., Roth, D.R., Seewald, W. & Lees, P. (2012). Safety of oral robenacoxib in the cat. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 35(3), 290-300.
- Kis, B., Snipes, J.A., Busija & D.W. (1995). Acetaminophen and the cyclooxygenase-3 puzzle: sorting out facts, fictions, and uncertainties. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 315(1), 1-7.
- Knapp, D.W., Glickman, N.W., Widmer, W.R., DeNicola, D.B., Adams, L.G., Kuczek, T., Bonney, P.L., DeGortari, A.E., Han, C. & Glickman, L.T. (2000). Cisplatin versus cisplatin combined with piroxicam in a canine model of human invasive urinary bladder cancer. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 46(3), 221-226.
- Knapp D.W., Richardson, R.C., Chan, T.C., Bottoms, G.D., Widmer, W.R., DeNicola, D.B., Teclaw, R., Bonney, P.L. & Kuczek, T. (1994). Piroxicam therapy in 34 dogs with transitional cell carcinoma of the urinary bladder. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 8(4), 273-278.

- Krause, W. & DuBois, R.N. (2000). Eicosanoids and the large intestine. *Prostaglandins Other Lipid Mediators*, 61(3-4), 145-161.
- Kurumbail, R.G., Stevens, A.M., Gierse, J.K., McDonald, J.J., Stegeman, R.A., Pak, J.Y., Gildehaus, D., Miyashiro, J.M., Penning, T.D., Seibert, K., Isakson, P.C., Stallings, W.C. (1996). Structural basis for selective inhibition of cyclooxygenase-2 by anti-inflammatory agents. *Nature*, 384(6610), 644-8.
- Kusewitt, D.F. & Rush, L.J. (2007). Neoplasia and tumor biology. In M.D. McGavin & J.P. Zachary (Eds.), *Pathologic basis of veterinary disease*. (4th ed.). (pp. 253-298). Missouri: Mosby Elsevier.
- Lana, S.E., Rutteman, G.R & Withrow, S. J. (2009). Tumors of the Mammary Gland. In S.J Withrow & D.M. Vails (Eds.) *Withrow & MacEwen's Small Animal Clinical Oncology* (4th ed). (pp. 628-633). St. Louis, Missouri: Saunders Elsevier.
- Lavalle, G.E., Bertagnolli, A.C., Tavares, W.L. & Cassali, G.D. (2009). Cox-2 expression in canine mammary carcinomas: correlation with angiogenesis and overall survival. *Veterinary Pathology*, 46(6), 1275-1280.
- Lee, C.H., Olson, P. & Evans, R.M. (2003). Minireview: lipid metabolism, metabolic diseases, and peroxisome proliferator-activated receptors. *Endocrinology*, 144(6), 2201-2207.
- Liang, Z., Yoon, Y., Votaw, J., Goodman, M.M., Williams, L. & Shim, H. (2005). Silencing of CXCR4 blocks breast cancer metastasis. *Cancer Research*, 65(3), 967-971.
- Liou, J.Y., Deng, W.G., Gilroy, D.W., Shyue, S.K. & Wu, K.K. (2001). Colocalization and interaction of cyclooxygenase-2 with caveolin-1 in human fibroblasts. *Journal of Biological Chemistry*, 276(37), 34975-34982.
- Maaser, K., Däubler, P., Barthel, B., Heine, B., von Lampe, B., Stein, H., Hoffmeister, B., Scherer, H. & Scherübl, H. (2003). Oesophageal squamous cell neoplasia in head and neck cancer patients: upregulation of Cox-2 during carcinogenesis. *British Journal of Cancer*, 88(8), 1217-1222.
- Maleki, Z., Shariat, S., Mokri, M. & Atri, M. (2012). ER-negative /PR-positive breast carcinomas or technical artifacts in immunohistochemistry? *Archives of Iranian Medicine*, 15(6), 366-369.
- Maniscalco, L., Iussich, S., de Las Mulas, J.M., Millán, Y., Biolatti, B., Sasaki, N., Nakagawa, T. & De Maria, R. (2012). Activation of AKT in feline mammary carcinoma: a new prognostic factor for feline mammary tumours. *Veterinary Journal*, 191(1), 65-71.
- Marchesi, F., Monti, P., Leone, B.E., Zerbi, A., Vecchi, A., Piemonti, L., Mantovani, A. & Allavena, P. (2004). Increased survival, proliferation, and migration in metastatic human pancreatic tumor cells expressing functional CXCR4. *Cancer Research*, 64(22), 8420-8427.
- Martínez, S.P., Hermoso, M., Farina, M., Ribeiro, M.L., Rapanelli, M., Espinosa, M., Villalón, M. & Franchi, A. (2006). 17-beta-Estradiol upregulates Cox-2 in the rat oviduct. *Prostaglandins & Other Lipid Mediators*, 80(3-4), 155-164.

- Masferrer, J.L., Leahy, K.M., Koki, A.T., Zweifel, B.S., Settle, S.L., Woerner, B.M., Edwards, D.A., Flickinger, A.G., Moore, R.J. & Seibert, K. (2000). Antiangiogenic and antitumor activities of cyclooxygenase-2 inhibitors. *Cancer Research*, 60(5), 1306-1311.
- Mayr, B., Blauensteiner, J., Edlinger, A., Reifinger, M., Alton, K., Schaffner, G. & Brem, G. (2000). Presence of p53 mutations in feline neoplasms. *Research in Veterinary Science*, 68(1), 63-70.
- Mayr, B., Reifinger, M., Loupal, G. (1998). Polymorphisms in feline tumour suppressor gene p53. Mutations in an osteosarcoma and a mammary carcinoma. *Veterinary Journal*, 155(1), 103-106.
- Mayr, B., Schaffner, G., Kurzbauer, R., Reifinger, M. & Schellander, K. (1995). Sequence of an exon of tumour suppressor p53 gene--a comparative study in domestic animals: mutation in a feline solid mammary carcinoma. *British Veterinary Journal*, 151(3), 325-329.
- McEntee, M.F., Cates, J.M. & Neilsen, N. (2002). Cyclooxygenase-2 expression in spontaneous intestinal neoplasia of domestic dogs. *Veterinary Pathology*, 39(4), 428-436.
- McInnis, C.L., Giuliano, E.A., Johnson, P.J. & Turk, J.R. (2007). Immunohistochemical evaluation of cyclooxygenase expression in corneal squamous cell carcinoma in horses. *American Journal of Veterinary Research*, 68(2), 165-170.
- McNeill, C.J., Sorenmo, K.U., Shofer, F.S., Gibeon, L., Durham, A.C., Barber, L.G., Baez, J.L. & Overley, B. (2009). Evaluation of adjuvant doxorubicin-based chemotherapy for the treatment of feline mammary carcinoma. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 23(1), 123-129.
- Merlie, J.P., Fagan, D., Mudd, J. & Needleman, P. (1988). Isolation and characterization of the complementary DNA for sheep seminal vesicle prostaglandin endoperoxide synthase (cyclooxygenase). *The Journal of Biological Chemistry*, 263(8), 3550-3553.
- Millanta, F., Calandrella, M., Bari, G., Niccolini, M., Vannozzi, I. & Poli, A. (2005a). Comparison of steroid receptor expression in normal, dysplastic, and neoplastic canine and feline mammary tissues. *Research in Veterinary Science*, 79(3), 225-232.
- Millanta, F., Calandrella, M., Citi, S., Della Santa, D. & Poli, A. (2005b). Overexpression of HER-2 in feline invasive mammary carcinomas: an immunohistochemical survey and evaluation of its prognostic potential. *Veterinary Pathology*, 42(1), 30-34.
- Millanta, F., Citi, S., Della Santa, D., Porciani, M. & Poli, A. (2006). Cox-2 expression in canine and feline invasive mammary carcinomas: correlation with clinicopathological features and prognostic molecular markers. *Breast Cancer Research and Treatment*, 98(1), 115-210.
- Millanta, F., Lazzeri, G., Mazzei, M., Vannozzi, I. & Poli, A. (2002). MIB-1 labeling index in feline dysplastic and neoplastic mammary lesions and its relationship with postsurgical prognosis. *Veterinary Pathology*, 39(1), 120-126.
- Millanta, F., Lazzeri, G., Vannozzi, I., Viacava, P. & Poli, A. (2002). Correlation of vascular endothelial growth factor expression to overall survival in feline invasive mammary carcinomas. *Veterinary Pathology*, 39(6), 690-696.

- Misdorp, W. (2002). Tumors of the mammary gland. In D.J. Meuten (Ed.), *Tumors in domestic animals* (4th ed.). (pp. 575-588). Iowa: Iowa State Press.
- Misdorp, W., Else, R. W., Hellmén, E. & Lipscomb, T. P. (1999). Histological classification of mammary tumors of the dog and the cat. In *World Health Organization international histological classification of tumors of domestic animals* (2nd ed., Vol. VII). Washington, D. C.: Armed Forces Institute of Pathology in cooperation with the American Registry of Pathology and the World Health Organization Collaborating Center for Worldwide Reference on Comparative Oncology.
- Misdorp, W., Romijn, A. & Hart, A.A. (1991). Feline mammary tumors: a case-control study of hormonal factors. *Anticancer Research*, 11(5), 1793-1797.
- Mohammed, S.I., Khan, K.N., Sellers, R.S., Hayek, M.G., DeNicola, D.B., Wu, L., Bonney, P.L. & Knapp, D.W. (2004). Expression of cyclooxygenase-1 and 2 in naturally-occurring canine cancer. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 70(5), 479-483.
- Mohammed, S.I., Knapp, D.W., Bostwick, D.G., Foster, R.S., Khan, K.N., Masferrer, J.L., Woerner, B.M., Snyder, P.W. & Koki, A.T. (1999). Expression of cyclooxygenase-2 (Cox-2) in human invasive transitional cell carcinoma (TCC) of the urinary bladder. *Cancer Research*, 59(22), 5647-5650.
- Monteiro-Riviere, N., Stinson, A. & Lois Calhoun, H. (1994). Integumento. In Dieter Dellmann, H., *Histología Veterinaria*. (2ª ed). (pp. 232-368). Zaragoza, Espanha: Ed. Acribia.
- Moore, A. (2006). Advances in the treatment of mammary neoplasia. In *Proceedings of World Congress WSAVA/FECAVA/CSAVA (31st World Small Animal Veterinary Congress, 12th European Congress, 14th Czech Small Animal Veterinary Association Congress)*, Praga, República Checa, 11-14 outubro 2006, pp.562-565.
- Moore, A.S., Beam, S.L., Rassnick, K.M. & Provost, R. (2003). Long-term control of mucocutaneous squamous cell carcinoma and metastases in a horse using piroxicam. *Equine Veterinary Journal*, 35(7), 715-718.
- Morris, J.S., Nixon, C., Bruck, A., Nasir, L., Morgan, I.M. & Philbey, A.W. (2008). Immunohistochemical expression of TopBP1 in feline mammary neoplasia in relation to histological grade, Ki67, ERalpha and p53. *Veterinary Journal*, 175(2), 218-226.
- Mukherjee, D., Nissen, S.E. & Topol, E.J. (2001). Risk of cardiovascular events associated with selective Cox-2 inhibitors. *JAMA: The Journal of the American Medical Association*, 286(8), 954-959.
- Mullins, M.N., Lana, S.E., Dernell, W.S., Ogilvie, G.K., Withrow, S.J. & Ehrhart, E.J. (2004). Cyclooxygenase-2 expression in canine appendicular osteosarcomas. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 18(6), 859-865.
- Munson, L. & Moresco, A. (2007). Comparative pathology of mammary gland cancers in domestic and wild animals. *Breast Disease*, 28, 7-21.



- Murakami, M., Naraba, H., Tanioka, T., Semmyo, N., Nakatani, Y., Kojima, F., Ikeda, T., Fueki, M., Ueno, A., Oh, S. & Kudo, I. (2000c). Regulation of prostaglandin E2 biosynthesis by inducible membrane-associated prostaglandin E2 synthase that acts in concert with cyclooxygenase-2. *The Journal of Biological Chemistry*, 275(42), 32783-32792.
- Murakami, Y., Tateyama, S., Rungsipipat, A., Uchida, K. & Yamaguchi, R. (2000a). Immunohistochemical analysis of cyclin A, cyclin D1 and P53 in mammary tumors, squamous cell carcinomas and basal cell tumors of dogs and cats. *Journal of Veterinary Medical Science*, 62(7), 743-750.
- Murakami, Y., Tateyama, S., Rungsipipat, A., Uchida, K. & Yamaguchi, R. (2000b). Amplification of the cyclin A gene in canine and feline mammary tumors. *Journal of Veterinary Medical Science*, 62(7), 783-787.
- Murata, T., Ushikubi, F., Matsuoka, T., Hirata, M., Yamasaki, A., Sugimoto, Y., Ichikawa, A., Aze, Y., Tanaka, T., Yoshida, N., Ueno, A., Oh-ishi, S. & Narumiya, S. (1997). Altered pain perception and inflammatory response in mice lacking prostacyclin receptor. *Nature*, 388(6643), 678-682.
- Murphy, S. (2009). Mammary gland tumors in cats: risk factors, clinical presentation, treatments and outcome. In *Proceedings European Society of Feline Medicine: Feline Symposium pre-BSAVA Congress, Birmingham, R.U., 1 abril 2009*, pp.11-16.
- Muto, T., Wakui, S., Takahashi, H., Maekawa, S., Masaoka, T., Ushigome, S. & Furusato, M. (2000). p53 gene mutations occurring in spontaneous benign and malignant mammary tumors of the dog. *Veterinary Pathology*, 37(3), 248-253.
- Mutoh, M., Watanabe, K., Kitamura, T., Shoji, Y., Takahashi, M., Kawamori, T., Tani, K., Kobayashi, M., Maruyama, T., Kobayashi, K., Ohuchida, S., Sugimoto, Y., Narumiya, S., Sugimura, T. & Wakabayashi, K. (2002). Involvement of prostaglandin E receptor subtype EP(4) in colon carcinogenesis. *Cancer Research*, 62(1), 28-32.
- Mutsaers, A.J., Glickman, N.W., DeNicola, D.B., Widmer, W.R., Bonney, P.L., Hahn, K.A. & Knapp, D.W. (2002). Evaluation of treatment with doxorubicin and piroxicam or doxorubicin alone for multicentric lymphoma in dogs. *Journal of the American Veterinary Medicine Association*, 220(12), 1813-1817.
- Mutsaers, A.J., Mohammed, S.I., DeNicola, D.B., Snyder, P.W., Glickman, N.W., Bennett, P.F., de Gortari, A.E., Bonney, P.L. & Knapp, D.W. (2005). Pretreatment tumor prostaglandin E2 concentration and cyclooxygenase-2 expression are not associated with the response of canine naturally occurring invasive urinary bladder cancer to cyclooxygenase inhibitor therapy. *Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 72(3), 181-186.
- Myung, S.J., Rerko, R.M., Yan, M., Platzer, P., Guda, K., Dotson, A., Lawrence, E., Dannenberg, A.J., Lovgren, A.K., Luo, G., Pretlow, T.P., Newman, R.A., Willis, J., Dawson, D. & Markowitz, S.D. (2006). 15-Hydroxyprostaglandin dehydrogenase is an in vivo suppressor of colon tumorigenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(32), 12098-12102.
- Nakanishi, M., Montrose, D.C., Clark, P., Nambiar, P.R., Belinsky, G.S., Claffey, K.P., Xu, D. & Rosenberg, D.W. (2008). Genetic deletion of mPGES-1 suppresses intestinal tumorigenesis. *Cancer Research*, 68(9), 3251-3259.

- Nasir, L., Krasner, H., Argyle, D.J. & Williams, A. (2000). Immunocytochemical analysis of the tumour suppressor protein (p53) in feline neoplasia. *Cancer Letters*, 155(1), 1-7.
- Nassar, A., Radhakrishnan, A., Cabrero, I.A., Cotsonis, G. & Cohen, C. (2007). Cox-2 expression in invasive breast cancer: correlation with prognostic parameters and outcome. *Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology*, 15(3), 255-259.
- Newman, S.J. & Mrkonjich, L. (2006). Cyclooxygenase-2 expression in feline pancreatic adenocarcinomas. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 18(6), 590-593.
- Niino, H., Otsuka, T., Ogami, E., Yamaoka, K., Nagano, S., Akahoshi, M., Nakashima, H., Arinobu, Y., Izuhara, K. & Niho, Y. MAP kinase pathways as a route for regulatory mechanisms of IL-10 and IL-4 which inhibit Cox-2 expression in human monocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 250(2), 200-205.
- Norrish, A.E., Jackson, R.T. & McRae, C.U. (1998). Non-steroidal anti-inflammatory drugs and prostate cancer progression. *International Journal of Cancer*, 77(4), 511-515.
- Novosad, C.A., Bergman, P.J., O'Brien, M.G., McKnight, J.A., Charney, S.C., Selting, K.A., Graham, J.C., Correa, S.S., Rosenberg, M.P. & Gieger, T.L. (2006). Retrospective evaluation of adjunctive doxorubicin for the treatment of feline mammary gland adenocarcinoma: 67 cases. *Journal of the American Animal Hospital Association*, 42(2), 110-120.
- Ogino, S., Kirkner, G.J., Nosho, K., Irahara, N., Kure, S., Shima, K., Hazra, A., Chan, A.T., Dehari, R., Giovannucci, E.L. & Fuchs, C.S. (2008). Cyclooxygenase-2 expression is an independent predictor of poor prognosis in colon cancer. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*, 14(24), 8221-8227.
- Ordás, J., Millán, Y., de los Monteros, A.E., Reymundo, C. & de las Mulas, J.M. (2004). Immunohistochemical expression of progesterone receptors, growth hormone and insulin growth factor-I in feline fibroadenomatous change. *Research in Veterinary Science*, 76(3), 227-233.
- Ordás, J., Millán, Y., Dios, R., Reymundo, C. & de Las Mulas, J.M. (2007). Proto-oncogene HER-2 in normal, dysplastic and tumorous feline mammary glands: an immunohistochemical and chromogenic in situ hybridization study. *BMC Cancer*, 7, 179.
- Oshima, M., Dinchuk, J.E., Kargman, S.L., Oshima, H., Hancock, B., Kwong, E., Trzaskos, J.M., Evans, J.F. & Taketo, M.M. (1996). Suppression of intestinal polyposis in Apc delta716 knockout mice by inhibition of cyclooxygenase 2 (Cox-2). *Cell*, 87(5), 803-809.
- Ospina, J.A., Brevig, H.N., Krause, D.N. & Duckles, S.P. (2003). Estrogen suppresses IL-1beta-mediated induction of Cox-2 pathway in rat cerebral blood vessels. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 286(5), H2010-2019.
- Overley, B., Shofer, F.S., Goldschmidt, M.H., Sherer, D. & Sorenmo, K.U. (2005). Association between ovariectomy and feline mammary carcinoma. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 19(4), 560-563.

- Pai, R., Szabo, I.L., Soreghan, B.A., Atay, S., Kawanaka, H. & Tarnawski, A.S. (2001). PGE(2) stimulates VEGF expression in endothelial cells via ERK2/JNK1 signaling pathways. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 286(5), 923-928.
- Park, K., Han, S., Shin, E., Kim, H.J. & Kim, J.Y. (2006). Cox-2 expression on tissue microarray of breast cancer. *European Journal of Surgical Oncology: the journal of the European Society of Surgical Oncology and the British Association of Surgical Oncology*, 32(10), 1093-1096.
- Park, S.W., Kim, H.S., Choi, M.S., Jeong, W.J., Heo, D.S., Kim, K.H. & Sung, M.W. (2011). The effects of the stromal cell-derived cyclooxygenase-2 metabolite prostaglandin E2 on the proliferation of colon cancer cells. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 336(2), 516-523.
- Peleteiro, M.C. (1994). Tumores mamários na cadela e na gata. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*, LXXXIX(509), 10-34.
- Pentland, A.P., Schoggins, J.W., Scott, G.A., Khan, K.N. & Han, R. (1999). Reduction of UV-induced skin tumors in hairless mice by selective Cox-2 inhibition. *Carcinogenesis*, 20(10), 1939-1944.
- Pereira, P.D., Lopes, C.C., Matos, A.J., Santos, M., Gärtner, F., Medeiros, R & Lopes, C. Cox-2 expression in canine normal and neoplastic mammary gland. *Journal of Comparative Pathology*, 140(4), 247-253.
- Pérez-Alenza, M.D., Jiménez, A., Nieto, A.I. & Peña, L. (2004). First description of feline inflammatory mammary carcinoma: clinicopathological and immunohistochemical characteristics of three cases. *Breast Cancer Research*, 6(4), 300-307.
- Perrone, G., Santini, D., Vincenzi, B., Zagami, M., La Cesa, A., Bianchi, A., Altomare, V., Primavera, A., Battista, C., Vetrani, A., Tonini, G. & Rabitti, C. (2005). Cox-2 expression in DCIS: correlation with VEGF, HER-2/neu, prognostic molecular markers and clinicopathological features. *Histopathology*, 46(5), 561-568.
- Perrone, G., Zagami, M., Altomare, V., Battista, C., Morini, S. & Rabitti, C. (2007). COX-2 localization within plasma membrane caveolae-like structures in human lobular intraepithelial neoplasia of the breast. *Virchows Archiv: An International Journal of Pathology*, 451(6), 1039-1045.
- Piazza, G.A., Alberts, D.S., Hixson, L.J., Paranka, N.S., Li, H., Finn, T., Bogert, C., Guillen, J.M., Brendel, K., Gross, P.H., Sperl, G., Ritchie, J., Burt, R.W., Ellsworth, L., Ahnen, D.J. & Pamukcu, R. (1997). Sulindac sulfone inhibits azoxymethane-induced colon carcinogenesis in rats without reducing prostaglandin levels. *Cancer Research*, 57(14), 2909-2915.
- Poligone, B. & Baldwin, A.S. (2001). Positive and negative regulation of NF-kappaB by Cox-2: roles of different prostaglandins. *Journal of Biological Chemistry*, 276(42), 38658-38664.
- Pradono, P., Tazawa, R., Maemondo, M., Tanaka, M., Usui, K., Saijo, Y., Hagiwara, K. & Nukiwa, T. (2002). Gene transfer of thromboxane A(2) synthase and prostaglandin I(2) synthase antithetically altered tumor angiogenesis and tumor growth. *Cancer Research*, 62(1), 63-66.
- Queiroga, F.L., Alves, A., Pires, I. & Lopes, C. (2007). Expression of Cox-1 and Cox-2 in canine mammary tumours. *Journal of Comparative Pathology*, 136(2-3), 177-185.

- Queiroga, F.L., Perez-Alenza, M.D., Silvan, G., Peña, L., Lopes, C. & Illera, J.C. (2005). Cox-2 levels in canine mammary tumors, including inflammatory mammary carcinoma: clinicopathological features and prognostic significance. *Anticancer Research*, 25(6B), 4269-4275.
- Queiroga, F.L., Pires, I., Lobo, L. & Lopes, C.S. (2010). The role of Cox-2 expression in the prognosis of dogs with malignant mammary tumours. *Research in Veterinary Science*, 88(3), 441-445.
- Queiroga, F.L., Pires, I., Parente, M., Gregório, H. & Lopes, C.S. (2011). Cox-2 over-expression correlates with VEGF and tumour angiogenesis in canine mammary cancer. *Veterinary Journal*, 189(1), 77-82.
- Quidville, V., Segond, N., Pidoux, E., Cohen, R., Jullienne, A. & Lausson, S. (2004). Tumor growth inhibition by indomethacin in a mouse model of human medullary thyroid cancer: implication of cyclooxygenases and 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase. *Endocrinology*, 145(5), 2561-2571.
- Raharison, F. & Sautet, J. (2006). Lymph drainage of the mammary glands in female cats. *Journal of Morphology*, 267(3), 292-299.
- Rasotto, R., Caliarì, D., Castagnaro, M., Zanetti, R. & Zappulli, V. (2011). An Immunohistochemical study of HER-2 expression in feline mammary tumours. *Journal of Comparative Pathology*, 144(2-3), 170-179.
- Rassnick, K.M. & Njaa, B.L. (2007). Cyclooxygenase-2 immunoreactivity in equine ocular squamous-cell carcinoma. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 19(4), 436-439.
- Reader, J., Holt, D. & Fulton, A. (2011). Prostaglandin E2 EP receptors as therapeutic targets in breast cancer. *Cancer Metastasis Reviews*, 30(3-4), 449-463.
- Reddy, B.S., Rao, C.V. & Seibert, K. (1996). Evaluation of cyclooxygenase-2 inhibitor for potential chemopreventive properties in colon carcinogenesis. *Cancer Research*, 56(20), 4566-4569.
- Ressel, L., Millanta, F., Caleri, E., Innocenti, V.M. & Poli, A. (2009). Reduced PTEN protein expression and its prognostic implications in canine and feline mammary tumors. *Veterinary Pathology*, 46(5), 860-868.
- Ristimäki, A., Sivula, A., Lundin, J., Lundin, M., Salminen, T., Haglund, C., Joensuu, H. & Isola J. (2002) Prognostic significance of elevated cyclooxygenase-2 expression in breast cancer. *The Journal of Cancer Research*, 62(3), 632–635.
- Rolland, P.H., Martin, P.M., Jacquemier, J., Rolland, A.M. & Toga, M. (1980). Prostaglandin in human breast cancer: Evidence suggesting that an elevated prostaglandin production is a marker of high metastatic potential for neoplastic cells. *Journal of the National Cancer Institute*, 64(5), 1061-1070.

- Rothwell, P.M., Fowkes, F.G., Belch, J.F., Ogawa, H., Warlow, C.P. & Meade, T.W. (2011). Effect of daily aspirin on long-term risk of death due to cancer: analysis of individual patient data from randomised trials. *The Lancet*, 377(9759), 31-41.
- Rubio, M.P., von Deimling, A., Yandell, D.W., Wiestler, O.D., Gusella, J.F. & Louis, D.N. (1993). Accumulation of wild type p53 protein in human astrocytomas. *Cancer Research*, 53(15), 3465-3467.
- Rudnick, J.A., Arendt, L.M., Klebba, I., Hinds, J.W., Iyer, V., Gupta, P.B., Naber, S.P. & Kuperwasser, C. (2011). Functional heterogeneity of breast fibroblasts is defined by a prostaglandin secretory phenotype that promotes expansion of cancer-stem like cells. *PLoS One*, 6(9), e24605.
- Rungsipipat, A., Tateyama, S., Yamaguchi, R., Uchida, K., Miyoshi, N. & Hayashi, T. (1999). Immunohistochemical analysis of c-yes and c-erbB-2 oncogene products and p53 tumor suppressor protein in canine mammary tumors. *Journal of Veterinary Medical Science*, 61(1), 27-32.
- Rutteman, G. R., & Kirpensteijn, J. (2003). Tumours of the mammary glands. In J. M. Dobson & B. D. X. Lascelles (Eds.), *BSAVA Manual of Canine and Feline Oncology* (2nd ed.). pp. 234-242). Gloucester: British Small Animal Veterinary Association.
- Saar, L.T. & Getty, R. (1986). Sistema Linfático do Carnívoro. In Getty, R. (Ed.) *Sisson/Grossman Anatomia dos Animais Domésticos*, (5<sup>o</sup> ed.). (pp. 1563,1564). Rio de Janeiro, Brasil: Guanabara Koogan.
- Salcedo, R., Zhang, X., Young, H.A., Michael, N., Wasserman, K., Ma, W.H., Martins-Green, M., Murphy, W.J. & Oppenheim, J.J. (2003). Angiogenic effects of prostaglandin E2 are mediated by up-regulation of CXCR4 on human microvascular endothelial cells. *Blood*, 102(6), 1966-1977.
- Sales, K.J., Katz, A.A., Howard, B., Soeters, R.P., Millar, R.P. & Jabbour, H.N. (2002). Cyclooxygenase-1 is up-regulated in cervical carcinomas: autocrine/paracrine regulation of cyclooxygenase-2, prostaglandin e receptors, and angiogenic factors by cyclooxygenase-1. *Cancer Research*, 62(2), 424-432.
- Sano, H., Kawahito, Y., Wilder, R.L., Hashiramoto, A., Mukai, S., Asai, K., Kimura, S., Kato, H., Kondo, M. & Hla T. (1995). Expression of cyclooxygenase-1 and -2 in human colorectal cancer. *Cancer Research*, 55(17), 3785-3789.
- Sayasith, K., Sirois, J. & Doré, M. (2009). Molecular characterization of feline Cox-2 and expression in feline mammary carcinomas. *Veterinary Pathology*, 46(3), 423-429.
- Schafer, A.I. (1995). Effects of nonsteroidal antiinflammatory drugs on platelet function and systemic hemostasis. *Journal of Clinical Pharmacology*, 35(3), 209-219.
- Schiffmann, S., Maier, T.J., Wobst, I., Janssen, A., Corban-Wilhelm, H., Angioni, C., Geisslinger, G., Grösch, S. (2008). The anti-proliferative potency of celecoxib is not a class effect of coxibs. *Biochemical Pharmacology*, 76(2), 179-187.

- Schrey, M.P. & Patel, K.V. (1995). Prostaglandin E2 production and metabolism in human breast cancer cells and breast fibroblasts. Regulation by inflammatory mediators. *British Journal of Cancer*, 72(6), 1412-1419.
- Schmidt, B.R., Glickman, N.W., DeNicola, D.B., de Gortari, A.E. & Knapp, D.W. (2001). Evaluation of piroxicam for the treatment of oral squamous cell carcinoma in dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 218(11), 1783-1786.
- Seixas, F., Palmeira, C., Pires, M.A., Bento, M.J. & Lopes, C. (2011). Grade is an independent prognostic factor for feline mammary carcinomas: a clinicopathological and survival analysis. *Veterinary Journal*, 187(1), 65-71.
- Sellon, R.K. (2008). Paraneoplastic syndromes in small animal medicine. In *Proceedings of European Veterinary Conference Voorjaarsdagen*, Amsterdão, Holanda, 24-26 abril 2008, pp.133-134.
- Selman, P.J., Mol, J.A., Rutteman, G.R. & Rijnberk, A. (1994). Progestin treatment in the dog. I. Effects on growth hormone, insulin-like growth factor I and glucose homeostasis. *European Journal of Endocrinology*, 131(4), 413-421.
- Selman, P.J., Mol J.A., Rutteman, G.R., van Garderen, E. & Rijnber, A. Endocrinology. (1994). Progestin-induced growth hormone excess in the dog originates in the mammary gland. *Endocrinology*, 134(1), 287-292.
- Sharpe, C.R., Collet, J.P., McNutt, M., Belzile, E., Boivin, J.F. & Hanley, J.A. (2000). Nested case-control study of the effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs on breast cancer risk and stage. *British Journal of Cancer*, 83(1), 112-120.
- Sheng, H., Shao, J., Morrow, J.D., Beauchamp, R.D. & DuBois, R.N. (1998). Modulation of apoptosis and Bcl-2 expression by prostaglandin E2 in human colon cancer cells. *Cancer Research*, 58(2), 362-366.
- Sheng, H., Shao, J., Washington, M.K. & DuBois, R.N. (2001). Prostaglandin E2 increases growth and motility of colorectal carcinoma cells. *The Journal Biological Chemistry*, 276(21), 18075-18081.
- Shibata, M., Kodani, I., Osaki, M., Araki, K., Adachi, H., Ryoke, K. & Ito, H. (2005). Cyclooxygenase-1 and -2 expression in human oral mucosa, dysplasias and squamous cell carcinomas and their pathological significance. *Oral Oncology*, 41(3), 304-312.
- Shiff, S.J., Shivaprasad, P. & Santini, D.L. (2003). Cyclooxygenase inhibitors: drugs for cancer prevention. *Current Opinion in Pharmacology*, 3(4), 352-361.
- Shono, T., Tofilon, P.J., Bruner, J.M., Owolabi, O. & Lang, F.F. (2001). Cyclooxygenase-2 expression in human gliomas: prognostic significance and molecular correlations. *Cancer Research*, 61(11), 4375-4381.
- Shureiqi, I., Chen, D., Lee, J.J., Yang, P., Newman, R.A., Brenner, D.E., Lotan, R., Fischer, S.M. & Lippman, S.M. (2000). 15-LOX-1: a novel molecular target of nonsteroidal anti-inflammatory drug-induced apoptosis in colorectal cancer cells. *Journal of the National Cancer Institute*, 92(14), 1136-1142.

- Simmons, D.L., Botting, R.M. & Hla, T. (2004). Cyclooxygenase isozymes: the biology of prostaglandin synthesis and inhibition. *Pharmacological reviews*, 56(3), 387-437.
- Simon, R., Nocito, A., Hübscher, T., Bucher, C., Torhorst, J., Schraml, P., Bubendorf, L., Mihatsch, M.M., Moch, H., Wilber, K., Schötzau, A., Kononen, J. & Sauter, G. (2001). Patterns of her-2/neu amplification and overexpression in primary and metastatic breast cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, 93(15), 1141-1146.
- Singh-Ranger, G., Salhab, M. & Mokbel, K. (2008). The role of cyclooxygenase-2 in breast cancer: review. *Breast Cancer Research and Treatment*, 109(2), 189-198.
- Skorupski, K.A., Overley, B., Shofer, F.S., Goldschmidt, M.H., Miller, C.A. & Sørenmo, K.U. (2005). Clinical characteristics of mammary carcinoma in male cats. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 19(1), 52-55.
- Slamon, D.J., Clark, G.M., Wong, S.G., Levin, W.J., Ullrich, A. & McGuire, W.L. (1987). *Science*, 35(4785), 177-182.
- Smith, W.L., DeWitt, D.L. & Garavito, R.M. (2000). Cyclooxygenases: structural, cellular, and molecular biology. *Annual Review of Biochemistry*, 69, 145-182.
- Song, X., Lin, H.P., Johnson, A.J., Tseng, P.H., Yang, Y.T., Kulp, S.K. & Chen, C.S. (2002). Cyclooxygenase-2, player or spectator in cyclooxygenase-2 inhibitor-induced apoptosis in prostate cancer cells. *Journal of the National Cancer Institute*, 94(8), 585-591.
- Sonoshita, M., Takaku, K., Sasaki, N., Sugimoto, Y., Ushikubi, F., Narumiya, S., Oshima, M. & Taketo, M.M. (2001). Acceleration of intestinal polyposis through prostaglandin receptor EP2 in Apc(Delta 716) knockout mice. *Nature Medicine*, 7(9), 1048-1051.
- Sørenmo, K.U. (2011). Mammary gland tumors in cats: risk factors, clinical presentation, treatments and outcome. In Proceedings of the 36th World Small Animal Veterinary Congress WSAVA, Jeju, Coreia, 14-17 outubro 2011, pp.764-767.
- Sørenmo, K.U., Goldschmidt, M.H., Shofer, F.S., Goldkamp, C. & Ferracone, J. (2004). Evaluation of cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 expression and the effect of cyclooxygenase inhibitors in canine prostatic carcinoma. *Veterinary and Comparative Oncology*, 2(1), 13-23.
- Soumaoro, L.T., Uetake, H., Higuchi, T., Takagi, Y., Enomoto, M. & Sugihara, K. (2004). Cyclooxygenase-2 expression: a significant prognostic indicator for patients with colorectal cancer. *Clinical Cancer Research*, 10(24), 8465-8471.
- Sousa, R.P.M. (2010). A expressão da COX-2 em patologias da glândula mamária da gata. Dissertação de mestrado em Métodos Biomoleculares. Universidade de Aveiro, Aveiro.
- Souza, C.H.M., Toledo-Piza, E., Amorin, E., Barboza, A. & Tobias, K.M. (2009). Inflammatory mammary carcinoma in 12 dogs: Clinical features, cyclooxygenase-2 expression, and response to piroxicam treatment. *Canadian Veterinary Journal*, 50(5), 506-510.
- Stack, E. & DuBois, R.N. (2001). Regulation of cyclo-oxygenase-2. *Best practice & research - Clinical gastroenterology*, 15(5), 787-800.

- Steinbach, G., Lynch, P.M., Phillips, R.K., Wallace, M.H., Hawk, E., Gordon, G.B., Wakabayashi, N., Saunders, B., Shen, Y., Fujimura, T., Su, L.K., Levin, B., Godio, L., Patterson, S., Rodriguez-Bigas, M.A., Jester, S.L., King, K.L., Schumacher, M., Abbruzzese, J., DuBois, R.N., Hittelman, W.N., Zimmerman, S., Sherman, J.W. & Kelloff, G. (2000). The effect of celecoxib, a cyclooxygenase-2 inhibitor, in familial adenomatous polyposis. *New England Journal of Medicine*, 342(26), 1946-1952.
- Subbaramaiah, K., Telang, N., Ramonetti, J.T., Araki, R., DeVito, B., Weksler, B.B. & Dannenberg, A.J. (1996). Transcription of cyclooxygenase-2 is enhanced in transformed mammary epithelial cells. *Cancer Research*, 56(19), 4424-4429.
- Sutherland, R.L. & Musgrove, E.A. (2004). Cyclins and breast cancer. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 9(1), 95-104.
- Szabo, S., Haislip, A.M. & Garry, R.F. (2005). Of mice, cats, and men: is human breast cancer a zoonosis? *Microscopy Research and Technique*, 68(3-4), 197-208.
- Takayama, K., García-Cardena, G., Sukhova, G.K., Comander, J., Gimbrone, M.A. Jr & Libby, P. (2002). Prostaglandin E2 suppresses chemokine production in human macrophages through the EP4 receptor. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(46), 44147-44154.
- Takeda, H., Sonoshita, M., Oshima, H., Sugihara, K., Chulada, P.C., Langenbach, R., Oshima, M., Taketo, M.M. (2003). Cooperation of cyclooxygenase 1 and cyclooxygenase 2 in intestinal polyposis. *Cancer Research*, 63(16), 4872-4877.
- Tan, W.C., Privett, O.S. & Goldyne, M.E. (1974). Studies of prostaglandins in rat mammary tumors induced by 7,12-dimethylbenz(a)anthracene. *Cancer Research*, 34(12), 3229-3231.
- Thamm, D.H., Ehrhart, E.J. 3rd, Charles, J.B. & Elce, Y.A. (2008). Cyclooxygenase-2 expression in equine tumors. *Veterinary Pathology*, 45(6), 825-828.
- Thompson, H.J., Jiang, C., Lu, J., Mehta, R.G., Piazza, G.A., Paranka, N.S., Pamukcu, R. & Ahnen, D.J. (1997). Sulfone metabolite of sulindac inhibits mammary carcinogenesis. *Cancer Research*, 57(2), 267-271.
- Thun, M.J., Namboodiri, M.M. & Heath, C.W. Jr. (1991). Aspirin use and reduced risk of fatal colon cancer. *New England Journal of Medicine*, 325(23), 1593-1596.
- Tiano, H.F., Loftin, C.D., Akunda, J., Lee, C.A., Spalding, J., Sessoms, A., Dunson, D.B., Rogan, E.G., Morham, S.G., Smart, R.C. & Langenbach, R. (2002). Deficiency of either cyclooxygenase (Cox)-1 or Cox-2 alters epidermal differentiation and reduces mouse skin tumorigenesis. *Cancer Research*, 62(12), 3395-3401.
- Tonelli, F., Valanzano, R., Messerini, L. & Ficari, F. (2000). Long-term treatment with sulindac in familial adenomatous polyposis: is there an actual efficacy in prevention of rectal cancer? *Journal of Surgical Oncology*, 74(1), 15-20.
- Torrance CJ, Jackson PE, Montgomery E, Kinzler KW, Vogelstein B, Wissner A, Nunes M, Frost, P. & Discafani, C.M. (2000). Combinatorial chemoprevention of intestinal neoplasia. *Nature Medicine*, 6(9), 1024-1028.



- Tortora, G., Caputo, R., Damiano, V., Melisi, D., Bianco, R., Fontanini, G., Veneziani, B.M., De Placido, S., Bianco, A.R. & Ciardiello, F. (2003). Combination of a selective cyclooxygenase-2 inhibitor with epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor ZD1839 and protein kinase A antisense causes cooperative antitumor and antiangiogenic effect. *Clinical Cancer Research*, 9(4), 1566-1572.
- Tsujii, M. & DuBois, R.N. (1995). Alterations in cellular adhesion and apoptosis in epithelial cells overexpressing prostaglandin endoperoxide synthase 2. *Cell*, 83(3), 493-501.
- Tsujii, M., Kawano, S. & DuBois, R.N. (1997). Cyclooxygenase-2 expression in human colon cancer cells increases metastatic potential. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(7), 3336-3340.
- Tsujii, M., Kawano, S., Tsuji, S., Sawaoka, H., Hori, M. & DuBois, R.N. (1998). Cyclooxygenase regulates angiogenesis induced by colon cancer cells. *Cell*, 93(5), 705-716.
- Tucker, O.N., Dannenberg, A.J., Yang, E.K., Zhang, F., Teng, L., Daly, J.M., Soslow, R.A., Masferrer, J.L., Woerner, B.M., Koki, A.T. & Fahey, T.J. 3rd. (1999). Cyclooxygenase-2 expression is up-regulated in human pancreatic cancer. *Cancer Research*, 59(5), 987-990.
- Tyler, J. (2002). Exame clínico das glândulas mamárias. In Radostits, O.M., Mayhew, I.G.J. & Houston, D.M., *Exame clínico e diagnóstico em veterinária* (pp. 572-578). Rio de Janeiro, Brasil: Guanabara Koogan.
- Valsecchi, M.E., Pomerantz, S.C., Jaslow, R. & Tester, W. (2009). Reduced risk of bone metastasis for patients with breast cancer who use Cox-2 inhibitors. *Clinical Breast Cancer*, 9(4), 225-230.
- Vane, J.R. (1971). Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. *New Biology*, 231(25), 232-235.
- Viste, J.R., Myers, S.L., Singh, B. & Simko, E. (2002). Feline mammary adenocarcinoma: tumor size as a prognostic indicator. *Canadian Veterinary Journal*, 43(1), 33-37.
- Wang, D., Buchanan, F.G., Wang, H., Dey, S.K. & DuBois, R.N. (2005). Prostaglandin E2 enhances intestinal adenoma growth via activation of the Ras-mitogen-activated protein kinase cascade. *Cancer Research*, 65(5), 1822-1829.
- Wang, D. & Dubois, R.N. (2006). Prostaglandins and cancer. *Gut - International Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 55(1), 115-122.
- Wang, D., Wang, H., Shi, Q., Katkuri, S., Walhi, W., Desvergne, B., Das, S.K., Dey, S.K. & DuBois, R.N. (2004). Prostaglandin E(2) promotes colorectal adenoma growth via transactivation of the nuclear peroxisome proliferator-activated receptor delta. *Cancer Cell*, 6(3), 285-295.
- Watanabe, K., Kawamori, T., Nakatsugi, S., Ohta, T., Ohuchida, S., Yamamoto, H., Maruyama, T., Kondo, K., Ushikubi, F., Narumiya, S., Sugimura, T. & Wakabayashi, K. (1999). Role of the prostaglandin E receptor subtype EP1 in colon carcinogenesis. *Cancer Research*, 59(20), 5093-5096.

- Wiese, F.W., Thompson, P.A. & Kadlubar, F.F. (2001). Carcinogen substrate specificity of human Cox-1 and Cox-2. *Carcinogenesis*, 22(1), 5-10.
- Williams, C.S., Mann, M. & DuBois, R.N. (1999). The role of cyclooxygenases in inflammation, cancer, and development. *Oncogene*, 18(55), 7908-7916.
- Winston, J., Craft, D.M., Scase, T.J. & Bergman, P.J. (2005). Immunohistochemical detection of HER-2/neu expression in spontaneous feline mammary tumours. *Veterinary and Comparative Oncology*, 3(1), 8-15.
- Wolff, H., Saukkonen, K., Anttila, S., Karjalainen, A., Vainio, H. & Ristimäki, A. (1998). Expression of cyclooxygenase-2 in human lung carcinoma. *Cancer Research*, 58(22), 4997-5001.
- Wu, A.W., Gu, J., Ji, J.F., Li, Z.F. & Xu, G.W. (2003). Role of Cox-2 in carcinogenesis of colorectal cancer and its relationship with tumor biological characteristics and patients' prognosis. *World Journal of Gastroenterology*, 9(9), 1990-1994.
- Yamamoto, Y. & Gaynor, R.B. (2004). I $\kappa$ B kinases: key regulators of the NF- $\kappa$ B pathway. *Trends in Biochemistry Science*, 29(2), 72-79.
- Yang, L., Yamagata, N., Yadav, R., Brandon, S., Courtney, R.L., Morrow, J.D., Shyr, Y., Boothby, M., Joyce, S., Carbone, D.P. & Breyer, R.M. Cancer-associated immunodeficiency and dendritic cell abnormalities mediated by the prostaglandin EP2 receptor. *The Journal of Clinical Investigation*, 111(5), 727-735.
- Yan, M., Rerko, R.M., Platzer, P., Dawson, D., Willis, J., Tong, M., Lawrence, E., Lutterbaugh, J., Lu, S., Willson, J.K., Luo, G., Hensold, J., Tai, H.H., Wilson, K. & Markowitz, S.D. (2004). 15-Hydroxyprostaglandin dehydrogenase, a Cox-2 oncogene antagonist, is a TGF- $\beta$ -induced suppressor of human gastrointestinal cancers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(50), 17468-17473.
- Yokoyama, C., Takai, T. & Tanabe, T. (1988). Primary structure of sheep prostaglandin endoperoxide synthase deduced from cDNA sequence. *FEBS letters*, 231(2), 347-351.
- Zerkowski, M.P., Camp, R.L., Burtress, B.A., Rimm, D.L. & Chung, G.G. (2007). Quantitative analysis of breast cancer tissue microarrays shows high cox-2 expression is associated with poor outcome. *Cancer Investigation*, 25(1), 19-26.
- Zha, S., Yegnasubramanian, V., Nelson, W.G., Isaacs, W.B. & De Marzo, A.M. (2004). Cyclooxygenases in cancer: progress and perspective. *Cancer Letters*, 215(1), 1-20.

## Anexos

### Anexo 1 – Correlação com aspetos clínico-patológicos (Clone SP21).

Teste exato de Fisher – Resultados COX-2 Clone SP21xClassificação Histológica segundo a OMS.

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearson Chi-Square	49,123 <sup>a</sup>	24	0,002	0,006	0,041
Likelihood Ratio	28,772	24	0,229	0,029	
Fisher's Exact Test	33,462			0,021	
Linear-by-Linear Association	3,517 <sup>b</sup>	1	0,061	0,065	
N of Valid Cases	21				

a. 35 cells (100,0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 0,05.

b. The standardized statistic is -1,875.

Teste exato de Fisher – Resultados COX-2 Clone SP21xGrau de malignidade segundo o sistema de classificação de Nottingham.

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearson Chi-Square	5,104 <sup>a</sup>	8	0,746	0,976	0,475
Likelihood Ratio	6,167	8	0,629	1,000	
Fisher's Exact Test	5,324			1,000	
Linear-by-Linear Association	0,030 <sup>b</sup>	1	0,862	0,914	
N of Valid Cases	21				

a. 15 cells (100%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 0,29.

b. The standardized statistic is 0,173.

Teste exato de Fisher – Resultados COX-2 Clone SP21xRaça.

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearson Chi-Square	1,658 <sup>a</sup>	4	0,798	0,714	0,314
Likelihood Ratio	2,395	4	0,663	0,714	
Fisher's Exact Test	3,026			1,000	
Linear-by-Linear Association	0,994 <sup>b</sup>	1	0,319	0,448	
N of Valid Cases	21				

a. 9 cells (90%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 0,10.

b. The standardized statistic is 0,997.

Teste exato de Fisher – Resultados COX-2 Clone SP21xEsterilização.

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearson Chi-Square	2,491 <sup>a</sup>	4	0,646	0,843	0,144
Likelihood Ratio	3,261	4	0,515	0,843	
Fisher's Exact Test	2,666			0,843	
Linear-by-Linear Association	1,691 <sup>b</sup>	1	0,193	0,267	
N of Valid Cases	21				

a. 8 cells (80,0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 0,48.

b. The standardized statistic is 1,300.

Teste exato de Fisher – Resultados COX-2 CloneSP21xLocalização do tumor na cadeia mamária.

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearson Chi-Square	9,201 <sup>a</sup>	12	0,686	0,828	0,287
Likelihood Ratio	9,677	12	0,644	0,899	
Fisher's Exact Test	9,462			0,926	
Linear-by-Linear Association	0,460 <sup>b</sup>	1	0,497	0,565	
N of Valid Cases	21				

a. 19 cells (95,0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 0,14.

b. The standardized statistic is 0,679.

Teste exato de Fisher – Resultados COX-2 CloneSP21xPresença de necrose.

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearson Chi-Square	6,159 <sup>a</sup>	4	0,188	0,190	0,571
Likelihood Ratio	8,502	4	0,075	0,103	
Fisher's Exact Test	6,087			0,110	
Linear-by-Linear Association	0,001 <sup>b</sup>	1	0,970	1,000	
N of Valid Cases	21				

a. 9 cells (90%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 0,38.

b. The standardized statistic is 0,038.

Teste de Kruskal-Wallis – Resultados COX-2 Clone SP21xTamanho da lesão.

	Tamanho
Chi-Square	1,140
df	4
Asymp. Sig.	0,888

Teste de Kruskal-Wallis – Resultados COX-2 CloneSP21xIdade.

	Idade
Chi-Square	3,680
df	4
Asymp. Sig.	0,451

## Anexo 2 – Correlação com outros marcadores (Clone SP21).

Teste exacto de Fisher – Resultados Cox-2 Clone SP21xRecetores de estrogénio.

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearson Chi-Square	5,625 <sup>a</sup>	4	0,229	0,191	0,543
Likelihood Ratio	7,660	4	0,105	0,157	
Fisher's Exact Test	5,514			0,191	
Linear-by-Linear Association	0,018 <sup>b</sup>	1	0,892	1,000	
N of Valid Cases	21				

a. 9 cells (90%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 136.

b. The standardized statistic is 136.

Teste exato de Fisher – Resultados COX-2 Clone SP21xRecetores de progesterona.

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearson Chi-Square	2,484 <sup>a</sup>	4	0,648	0,922	0,429
Likelihood Ratio	3,131	4	0,536	0,922	
Fisher's Exact Test	2,730			0,922	
Linear-by-Linear Association	0,128 <sup>b</sup>	1	0,720	0,854	
N of Valid Cases	21				

a. 9 cells (90%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 38.

b. The standardized statistic is 358.

Teste exato de Fisher – Resultados COX-2 Clone SP21xNíveis de HER-2.

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearson Chi-Square	8,888 <sup>a</sup>	12	0,713	0,803	0,451
Likelihood Ratio	11,399	12	0,495	0,646	
Fisher's Exact Test	11,733			0,596	
Linear-by-Linear Association	,055 <sup>b</sup>	1	0,815	0,839	
N of Valid Cases	21				

a. 20 cells (100,0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 0,10.

b. The standardized statistic is -,234.

Teste de Kruskal-Wallis – Resultados COX-2 Clone SP21xNíveis de expressão de Ki-67.

	Ki-67
Chi-Square	2,484
df	4
Asymp. Sig.	0,648

**Anexo 3 – Correlação com a sobrevivência (Clone SP21).**

	Chi-Square	df	Sig.
Log Rank (Mantel-Cox)	7,305	4	0,121
Breslow (Generalized Wilcoxon)	5,845	4	0,211
Tarone-Ware	6,520	4	0,164